

**PROGRAMME EUROPEEN INTERREG IVA FRANCE (MANCHE)-ANGLETERRE**



**FRANCE (CHANNEL)-ENGLAND INTERREG IVA EUROPEAN PROGRAMME**



**DETERMINATION D'INDICATEURS  
ENVIRONNEMENTAUX PERTINENTS : UNE STRATEGIE  
POUR L'EUROPE (DIESE)**

**RAPPORT SCIENTIFIQUE FINAL**



**Version française**



**Juillet 2013**

## AVANT PROPOS

Le projet DIESE est né d'une volonté de collaboration entre différents partenaires afin de contribuer à l'amélioration de nos connaissances et à la gestion de notre environnement commun. Les actions des scientifiques qui constituent le cœur de ce projet ont été permises et soutenues activement par de nombreuses personnes et organismes. Les auteurs de ce rapport tiennent à remercier ces femmes et ces hommes pour ce soutien extrêmement important. Cela inclut les personnes des institutions et groupes suivant :

- la communauté européenne à l'origine de l'appel d'offre et du principal soutien financier. Derrière elle se trouve l'ensemble des citoyens sensibles à notre environnement ;
- la région Haute-Normandie et le personnel de la cellule « Interreg », cheville ouvrière essentielle de l'organisation et du bon fonctionnement du projet, mais aussi partenaires enthousiastes et amicaux ;
- l'ONEMA et l'Environmental Agency, deux organismes dont les soutiens financiers mais aussi les actions diverses et le personnel permettent d'œuvrer conjointement pour une meilleure gestion des milieux aquatiques ;
- les organismes de pêche et de gestion des espaces naturels qui ont contribué à la collection d'échantillons et ont enrichi les connaissances acquises sur les milieux qu'ils connaissent bien :
  - La brème d'Elbeuf ;
  - La Carpe posienne ;
  - La Réserve Naturelle Nationale de la Baie de Saint-Brieuc ;
  - La Réserve Naturelle Nationale de l'Estuaire de la Seine ;
  - Le GIP Seine-Aval.
- les personnels des Universités et autres partenaires de ce projet qui ont facilité et permis les actions des chercheurs.

Les auteurs de ce projet scientifique expriment toute leur sympathie et remerciements aux personnes qu'ils ont pu côtoyer lors de la réalisation de ce programme.

## LISTE DES PARTENAIRES DU PROGRAMME

CHEF DE FILE / LEAD PARTNER	
Nom de l'organisation	Université du Havre
Statut	Organisme National et Public
Type d'organisation	Etablissement d'enseignement et de recherche
Adresse	25, rue Philippe Lebon, BP540, 766058 Le Havre
Contact	Pr. C. Minier
email	<a href="mailto:minier@univ-lehavre.fr">minier@univ-lehavre.fr</a>
Téléphone	+33 (0) 232 744 303
AUTRES PARTENAIRES / OTHER PARTNERS	
Nom de l'organisation	University of Sussex
Statut	Public establishment
Type d'organisation	Research and Education
Adresse	Sussex House, Falmer, Brighton
Contact	Pr. E.M. Hill
email	<a href="mailto:E.M.Hill@sussex.ac.uk">E.M.Hill@sussex.ac.uk</a>
Téléphone	+44 (0) 1273 872862
Nom de l'organisation	Marine Biological Association
Statut	Charity : Research and Education
Type d'organisation	Research Institute
Adresse	Citadel Hill, Plymouth PL1 2PB, Devon, United Kingdom
Contact	Dr W J Langston
email	<a href="mailto:wjl@mba.ac.uk">wjl@mba.ac.uk</a>
Téléphone	+44 (0)1752 633331
Nom de l'organisation	Université de Bretagne Occidentale
Statut	Organisme National et Public
Type d'organisation	Etablissement d'enseignement et de recherche
Adresse	Place Nicolas Copernic 29280 Plouzané
Contact	Pr. J. Laroche
email	<a href="mailto:Jean.Laroche@univ-brest.fr">Jean.Laroche@univ-brest.fr</a>
Téléphone	+33 (0)2 98 49 86 26 ; +33 (0)2 98 49 87 43
Nom de l'organisation	Université du Littoral - Côte d'Opale
Statut	Organisme National et Public
Type d'organisation	Etablissement d'enseignement et de recherche
Adresse	Avenue Foch, 62930 Wimereux
Contact	Pr. R. Amara
email	<a href="mailto:Rachid.Amara@mren2.univ-littoral.fr">Rachid.Amara@mren2.univ-littoral.fr</a>
Téléphone	+33 (0) 328 237 320
Nom de l'organisation	INERIS
Statut	Etablissement public à Caractère Industriel et Commercial
Type d'organisation	Recherche
Adresse	Parc Technologique ALATA, BP 2, 60550 Verneuil en Halatte
Contact	Dr. W. Sanchez
email	<a href="mailto:wilfried.sanchez@ineris.fr">wilfried.sanchez@ineris.fr</a>
Téléphone	+33 (0) 3 44 61 81 21

Nom de l'organisation	Toxem
Statut	Etablissement privé
Type d'organisation	Entreprise
Adresse	25, rue Philippe Lebon, BP540, 766058 Le Havre
Contact	Dr. J. Couteau
email	jerome.couteau@toxem.com
Téléphone	+33 (0) 619 357 311

## RESUME

Le programme DIESE (Détermination d'Indicateurs Environnementaux pertinents : une Stratégie pour l'Europe) a réuni des équipes de recherche françaises et britanniques en association avec une entreprise privée et les organismes responsables de la gestion des masses d'eau des deux pays dans un effort commun nécessaire pour documenter les effets écotoxicologiques liés à la présence de composés chimiques dans l'environnement. Afin de contribuer à une meilleure connaissance et gestion de l'environnement, le programme a déployé ses efforts pour (1) utiliser les connaissances existantes et acquises au cours du programme permettant d'identifier des problèmes biologiques importants, (2) accroître notre compréhension des mécanismes mis en jeu et ainsi être en mesure d'identifier les causes des dysfonctionnements et (3) de parfaire notre système d'expertise et de vigilance afin de mieux suivre les évolutions de l'environnement et de faire un diagnostic pertinent.

La première partie du programme a permis d'identifier des effets biologiques manifestes et, à l'aide de tests biologiques révélateurs des mécanismes d'action des composés, d'identifier les composés responsables présents dans l'environnement. En lien avec la féminisation des poissons observées dans de nombreuses espèces et cours d'eau, une recherche de composés œstrogéniques mais aussi anti-androgéniques a été menée. Cette recherche a permis de développer un nouveau test d'œstrogénicité chez le gardon et de mettre en œuvre le test ER-Calux pour les effets anti-androgènes. Les résultats ont montré que, outre des biocides tels que le triclosan et le chlorophène, de nombreux composés de la famille des hydrocarbures aromatiques sont susceptibles de perturber la physiologie des organismes en interagissant avec le récepteur aux androgènes. Six d'entre eux ont été identifiés dans les extraits de sédiments. Il s'agit du benzanthrène, du fluoranthène, du 1,2-benzodiphenylene sulfide, du benzo[a]pyrène, du benz[a]anthracène, et du 9-phenylcarbazole.

La seconde partie a permis de documenter et de mieux comprendre les mécanismes d'action des composés chimiques conduisant aux altérations physiologiques. Ce travail constitue un défi particulier pour les mollusques car les connaissances sur leur physiologie et endocrinologie est encore fragmentaire. De nouvelles technologies incluant des analyses métabolomiques et transcriptomiques ont ainsi été mises en œuvre pour avoir une vision relativement exhaustive des effets altérant les mollusques. Les recherches métabolomiques ont permis de montrer des effets des œstrogènes sur le métabolisme des eicosanoïdes et des amines tandis que les stratégies transcriptomiques ont identifiés des gènes dont l'expression est altérée chez les scrobiculaires intersexués et laissent penser que ces modifications physiologiques profondes résultent d'une démasculinisation des organismes mâles. Des études protéomiques ont aussi été mises en œuvre pour élucider les mécanismes d'action des polluants sur la physiologie des poissons. Ces études se sont généralement inscrites au sein d'investigations utilisant un ensemble de marqueurs à la fois moléculaires et écologiques dans une démarche intégrative. Les résultats ont montré que la physiologie de la reproduction des poissons femelles est altérée de façon inquiétante, que d'autres altérations de l'endocrinologie des poissons tels que des effets androgéniques sont à l'œuvre et que le système immunitaire est aussi soumis à des pressions via l'exposition à des composés chimiques tels que les œstrogènes de l'environnement. De façon notable, le système immunitaire, comme le système endocrinien, semble présenter des périodes de sensibilité particulière au cours du développement. Les mesures intégratives sur la croissance ou le métabolisme général soulignent l'importance des conditions environnementales dans la physiologie des organismes et en particulier les variabilités inter-sites concernant la température, la présence de conditions hypoxiques et les stratégies de développement. Elles apportent donc un éclairage particulier qui permet de mettre en perspective et de comprendre les situations et les conséquences des conditions naturelles sur les populations.

Dans un troisième volet, les recherches menées dans le cadre du programme DIESE ont eu pour objectif de développer et de tester des méthodologies d'aide à la gestion de l'environnement. Deux voies d'études particulières ont été suivies. La première a consisté à déployer, sur tout ou partie de la région d'étude, des biomarqueurs robustes afin d'établir une cartographie susceptible de mettre en évidence les masses d'eaux à risque et de les mettre en relation avec les sources de ces perturbations. La seconde voie a permis d'explorer les méthodologies d'utilisation des biomarqueurs et leur intégration en un indice simple et clair. Ainsi des cartes partielles ou totales de l'espace Manche

ont été produites afin de rapporter la présence de composés mutagènes ou anti-androgènes dans les sédiments des côtes françaises et britanniques. De même une cartographie de modifications profondes de la physiologie de la reproduction des poissons et des mollusques a été dressée. Les modifications chez les gardons et les scrobiculaires sont identifiées par la présence de mâles intersexués, et par le phénomène d'imposex chez les nuelles. Ces cartographies restent parfois à compléter et un travail nécessaire consistera à confronter ces informations afin d'en dégager des enseignements pertinents pour la gestion de l'environnement, un objectif auquel le programme DIESE aura contribué en apportant certaines informations nécessaires et originales.

## SOMMAIRE

	page
<b>Avant-propos .....</b>	<b>i</b>
<b>Liste des partenaires du programme .....</b>	<b>ii</b>
<b>Résumé .....</b>	<b>iv</b>
<b>I. Introduction.....</b>	<b>1</b>
<b>II. Identification des composés actifs.....</b>	<b>3</b>
II.1. Introduction.....	3
II.2. Identification de composés anti-androgéniques.....	3
II.3. Identification de perturbateurs endocriniens à l'aide de cultures d'explants de foie de gardon .....	8
<b>III. Identification des mécanismes de toxicité.....</b>	<b>13</b>
III.1. Introduction.....	13
III.2. Identification de mécanismes endocriniens par une approche métabolomique et génomique chez la moule ( <i>Mytilus edulis</i> ) .....	14
III.3. Identification de voies cellulaires conduisant à la féminisation des scrobiculaires mâles ( <i>Scrobicularia plana</i> ) .....	24
III.4. Identifications de mécanismes d'immunotoxicité chez le bar, ( <i>Dicentrarchus labrax</i> ) ...	27
III.5. Identification d'un mécanisme androgéno-régulé chez le chabot ( <i>Cottus sp.</i> ) .....	32
III.6. Identification de perturbations endocrines chez les gardons femelles ( <i>Rutilus rutilus</i> ) ....	37
III.7. Etude intégrée des perturbations chez le flet ( <i>Platichthys flesus</i> ).....	40
<b>IV. Surveillance des effets <i>in situ</i> à travers l'étude de la région Manche.....</b>	<b>56</b>
IV.1. Introduction.....	56
IV.2. Identification de gènes de référence pour la quantification des biomarqueurs par qPCR..	56
IV.3. Identification d'une nouvelle espèce sentinelle : Le chabot ( <i>Cottus sp.</i> ).....	58
IV.4. Utilisation de biomarqueurs biochimiques et physiologiques pour évaluer les effets des contaminants chimiques sur les juvéniles de poisson marin.....	60
IV.5. Développement d'un indice multi-biomarqueurs.....	72
IV.6. Cartographie des effets de la contamination chez les poissons sauvages.....	75
IV.7. Cartographie de l'activité anti-androgénique (AA) en zones côtières et estuariennes.....	76
IV.8. Analyse de l'imposex et de l'intersex chez les mollusques.....	82
IV.8. Cartographie de la mutagénicité des sédiments en Manche.....	100
<b>V. Conclusions.....</b>	<b>103</b>
<b>VI. Références bibliographiques.....</b>	<b>108</b>
<b>VII. Communication des résultats.....</b>	<b>120</b>

## I. INTRODUCTION

La santé des organismes, dont celle de l'homme, est un équilibre qui peut être rompu par des situations exceptionnelles ou qui peut être déstabilisé de façon plus insidieuse sous les effets conjugués de multiples facteurs moins exceptionnels mais que le temps rend non moins délétères. Le terme de santé est quelque peu général et difficile à caractériser. Il regroupe un ensemble de conditions permettant le bon fonctionnement des différents organes et des fonctions physiologiques nécessaires, notamment, au développement, à la croissance et à la reproduction des organismes. Ainsi c'est un paramètre dont chacun peut reconnaître l'importance et qui revêt une signification toute particulière dans le cas de l'environnement et pour les multiples organismes qui le compose. Nos connaissances actuelles nous permettent de comprendre que les progrès de la médecine, de l'alimentation et de la protection individuelle conduisent à une amélioration de la longévité et de la vie des personnes et, en conséquence, de la nécessité de contrôler un ensemble de paramètres liés à cette santé qui est essentielle aux populations.

Ces progrès mettent en lumière l'importance des connaissances scientifiques qui conduisent à identifier les risques, à les quantifier et à envisager les mesures correctives. C'est ainsi que le programme DIESE (Détermination d'Indicateurs Environnementaux pertinents : une Stratégie pour l'Europe) vise d'une part à accroître les connaissances vis-à-vis d'un ensemble de paramètres biologiques essentiels au bon fonctionnement des organismes et d'autre part à identifier les dysfonctionnements observables, de mettre en lumière les causes de ces dysfonctionnements et de proposer des outils permettant de faire un diagnostic pertinent aidant à la gestion des risques identifiés.

Considérant que certains risques revêtent une importance particulière, que certaines fonctions biologiques et physiologiques sont cruciales pour le bon fonctionnement des organismes, les travaux menés au sein du programme de recherche se focalisent sur l'endocrinologie, essentielle au bon fonctionnement de la reproduction, du développement et du métabolisme, sur l'immunologie, fonction centrale pour la défense des organismes et sur les mécanismes de cancérogénèse, exemple manifeste de dysfonctionnement des fonctions biologiques. En effet, les données de la littérature montrent que les cancers sont la première cause de mortalité humaine dans de nombreux pays développés dont la France (Priou et Barbiéri, 2012). Parmi les cancers, les plus fréquents sont en lien avec le système endocrinien, cancer du sein chez la femme, cancer de la prostate chez l'homme (Binder-Foucard et al., 2013). Les récents travaux sur la reproduction humaine indiquent que cette fonction est altérée en France depuis plus de 30 ans conduisant à une réduction de la fertilité de près de 1% par an (Rolland et al., 2013) et que de nombreux désordres endocriniens peuvent conduire à des dysfonctionnements métaboliques responsables, pour partie, de la seconde cause de mortalité humaine (García-Mayor et al., 2012). Et enfin, les altérations du système immunitaire correspondent à la quatrième cause de mortalité humaine (Priou et Barbiéri, 2012).

La responsabilité de l'environnement dans les dysfonctionnements biologiques est évidente. L'augmentation des cancers humains par exemple ne peut être expliquée totalement par l'augmentation de l'espérance de vie et l'amélioration du dépistage (Binder-Foucard et al., 2013). De nombreux cancers pourraient ainsi être évités. Cette composante environnementale est aussi très évidente lorsqu'on considère les altérations des processus physiologiques chez les organismes sauvages car les observations de ces dysfonctionnements sont largement éclairés et démontrés expérimentalement. Diverses perturbations du système endocrinien sont par exemple identifiées et quantifiées chez des populations aquatiques sauvages et peuvent être reproduites expérimentalement (Ketata et al., 2008 ; Minier et Amara, 2008). Les organismes sauvages sont ainsi de bons témoins des effets délétères pouvant se produire et de bonnes sentinelles des effets biologiques. C'est donc à partir de cette constatation que les travaux se sont concentrés sur des poissons et des mollusques vivant dans



notre environnement afin de mieux documenter les dysfonctionnements observés et de mieux en comprendre les mécanismes.

Le présent rapport se découpe en trois parties. La première vise à identifier les effets biologiques manifestes et les composés responsables. La seconde partie permet de documenter et de mieux comprendre les mécanismes conduisant aux altérations physiologiques. Enfin la troisième partie permet de développer les méthodologies pouvant apporter des informations pertinentes pour mieux gérer notre environnement. Les travaux illustrent la stratégie définie dans le programme : elle consiste à (1) utiliser les connaissances acquises pour identifier les problèmes, (2) accroître nos connaissances pour mieux comprendre et être en mesure d'identifier les causes des dysfonctionnements et (3) parfaire notre système d'expertise et de vigilance afin de mieux suivre les évolutions de l'environnement et de faire un diagnostic pertinent.

## II. IDENTIFICATION DE COMPOSES ACTIFS

### II.1. Introduction

Les organismes vivants dont l'homme sont continuellement exposés à des mélanges de composés chimiques présents dans l'environnement. Près de 100 000 composés sont considérés être d'utilisation courante et donc susceptibles de faire partie du mélange présent dans un environnement donné. Certains de ces contaminants peuvent avoir une activité particulièrement délétère et il existe une inquiétude légitime concernant certains composés émergents qui ne sont encore ni mesurés ni sujet à une régulation législative, notamment dans la directive cadre sur l'eau.

L'identification de composés actifs présents dans les effluents urbains et les eaux usées est ainsi un problème critique. Les décisions réglementaires dépendent de l'identification, des niveaux de contamination et de leur toxicité. Afin de contribuer à l'identification de composés pouvant se révéler particulièrement délétères pour la santé des organismes, les partenaires du programme DIESE ont adopté une stratégie d'identification de composés présents dans l'environnement aquatique. Cette stratégie est basée sur la mesure de l'activité biologique des composés présents dans des extraits environnementaux. En effet, plutôt que d'inventorier un ensemble de composés chimiques, il apparaît important de déterminer ceux qui ont un effet critique sur des mécanismes clés des organismes vivants. L'utilisation de tests biologiques permet de mesurer des activités importantes qui servent de guide pour l'identification chimique des composés responsables.

Ce rapport fait état de la recherche de composés à activité androgénique et anti-androgénique ainsi que du développement d'un test permettant la recherche de composés œstrogéniques et anti-œstrogéniques spécifiquement chez le poisson.

### II.2. Identification de composés anti-androgéniques

Jusqu'à présent, l'identification des perturbateurs endocriniens dans les milieux aquatiques a été principalement axée sur les composés œstrogéniques, à savoir les œstrogènes stéroïdiens, et les œstrogénomimétiques comme certains alkyl phénols. Ceux-ci agissent comme des agents féminisant, mais d'autres contaminants agissent comme anti-androgènes (AA), des agents qui peuvent également inhiber la voie de masculinisation naturelle dans les organismes aquatiques. Les mesures dans des effluents de stations d'épuration du Royaume-Uni ont révélé que la majorité des rejets contient des composés œstrogéniques ainsi que des AA. Les publications concernant la détection d'activité AA dans les sédiments, l'eau et les poissons des rivières européennes suggèrent que la présence d'AA dans l'environnement aquatique peut être très répandue (Urbatzka et al., 2007; Weiss et al., 2009; Hill et al., 2010). En outre, la féminisation observée chez les poissons sauvages a été corrélée à l'exposition à la fois aux œstrogènes ou aux anti-androgènes indiquant que les AA peuvent affecter la différenciation sexuelle des espèces sauvages (Jobling et al., 2009). De plus, il existe une incidence élevée de l'intersexualité chez les mollusques bivalves, *Scrobicularia Plana*, dans les estuaires du Royaume-Uni et cette condition semble associée à la féminisation et/ou à la démasculinisation des mâles (Langston et al., 2009 ; Chesman et al., 2006). Ces observations indiquent que les perturbateurs endocriniens peuvent être présents dans les sédiments côtiers et estuariens, et qu'il est nécessaire d'identifier les AA en présence.

Les anti-androgènes peuvent se lier au récepteur des androgènes (AR), mais sont incapables d'activer la transcription. Ils agissent alors comme des antagonistes. Les structures de produits chimiques ayant de telles propriétés peuvent être extrêmement variées (Rostkowski et al, 2011;

Vinggaard et al, 2008) et il est donc important d'utiliser des méthodes qui ne font pas d'hypothèses *a priori* quant à la nature des produits chimiques impliqués. Ces méthodes correspondent aux mesures des activités des AA à l'aide de tests spécifiques, et l'identification des composés à partir de ces activités.

Les principaux objectifs de ce travail étaient de:

- enquêter sur les profils AA dans les sédiments côtiers de la région transmanche et de déterminer l'identité des principaux polluants AA dans les sites contaminés.
- déterminer la nature des composés AA s'accumulant dans les scrobiculaires échantillonnées dans les sites contaminés.

Des méthodes ont été développées pour réaliser les extraits à partir de sédiments et de les tester en utilisant un bioessai basé sur l'utilisation de cellules exprimant le récepteur aux androgènes et permettant d'activer un gène rapporteur (AR-CALUX). Les sédiments montrant des niveaux élevés d'activité AA ont été fractionnés par chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC) et les contaminants présents dans les fractions actives ont été analysés par des techniques de spectrométrie de masse (GC-EI-MS et LC-ESI-MS). Le cas échéant, les composés identifiés et disponible commercialement ont été testés pour leur activité AA et utilisés pour confirmer l'identité de structure par rapport aux temps de rétention et les données de masse.

#### *Identification de composés anti-androgéniques actifs dans les sédiments*

L'activité AA présente dans les sédiments a été analysée en utilisant une combinaison de méthodes chromatographique et des essais *in vitro*. Les profils d'activité AA étaient similaires pour de nombreux sites du Royaume-Uni et la plupart des fractions actives éluaient entre 11 et 31 minutes (Fig. 1A et 1B). Les profils diffèrent de celui du site de Rouen qui contenait aussi un ensemble de fractions anti-androgènes non polaires éluant entre 29-39 minutes (Fig. 1).

Les fractions issues du sédiment le plus contaminé des sites étudiés (Northam), ont été analysées par spectrométrie de masse. Les contaminants les plus abondants présents dans les fractions actives étaient des hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP ; tableau 1). Certaines structures planes comme le benzo-[a]-pyrène et benzo-[a]-anthracène ont montré des niveaux d'activité similaires à celle du flutamide. D'autres molécules actives sont des hétérocycliques contenant du soufre ou de l'azote, telles que le sulfure de 1,2-benzodiphenylene et le phenylcarbazole. Certaines structures telles que le benzanthrone sont des métabolites de HAP. Fait intéressant, les structures actives prédominantes qui avaient déjà été identifiées dans les effluents des stations d'épuration, les germicides triclosan et chlorophen, sont également présentes (Hill et al, 2010; Rostkowski et al, 2011), mais ces composés sont présents en très faibles quantités dans les échantillons de sédiments côtiers. Cela indique que la majorité de la pollution contribuant à l'activité AA dans les sédiments est née de déversements d'hydrocarbures fossiles, que ce soit à partir de l'activité de transport ou d'industries de raffinage. L'identification de HAP tels que le benzo-[a]-pyrène comme anti-androgènes potentiels suggère que ces composés peuvent avoir deux mécanismes de toxicité car ils sont généralement associés à l'activation de systèmes de biotransformation.

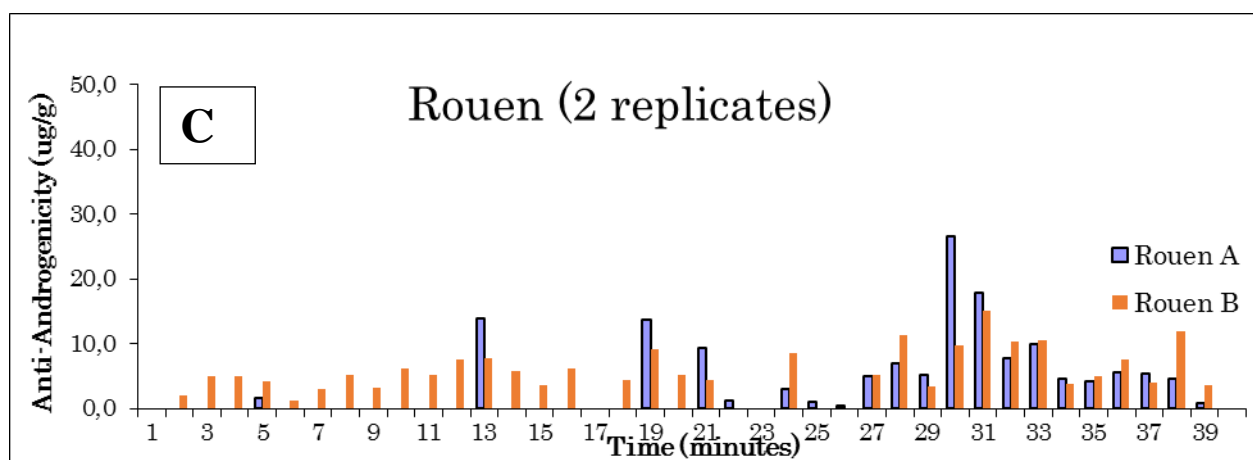
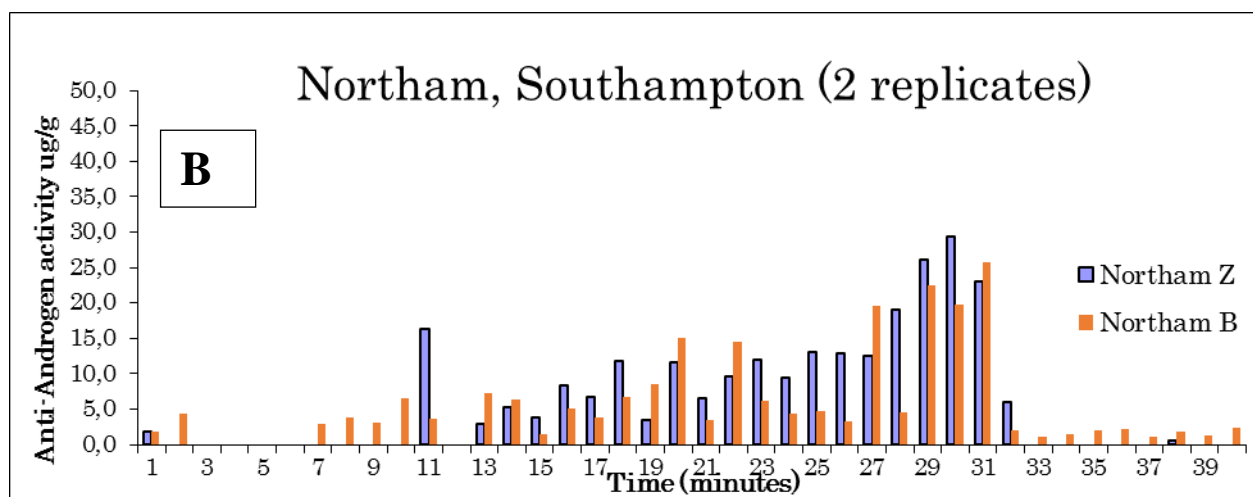
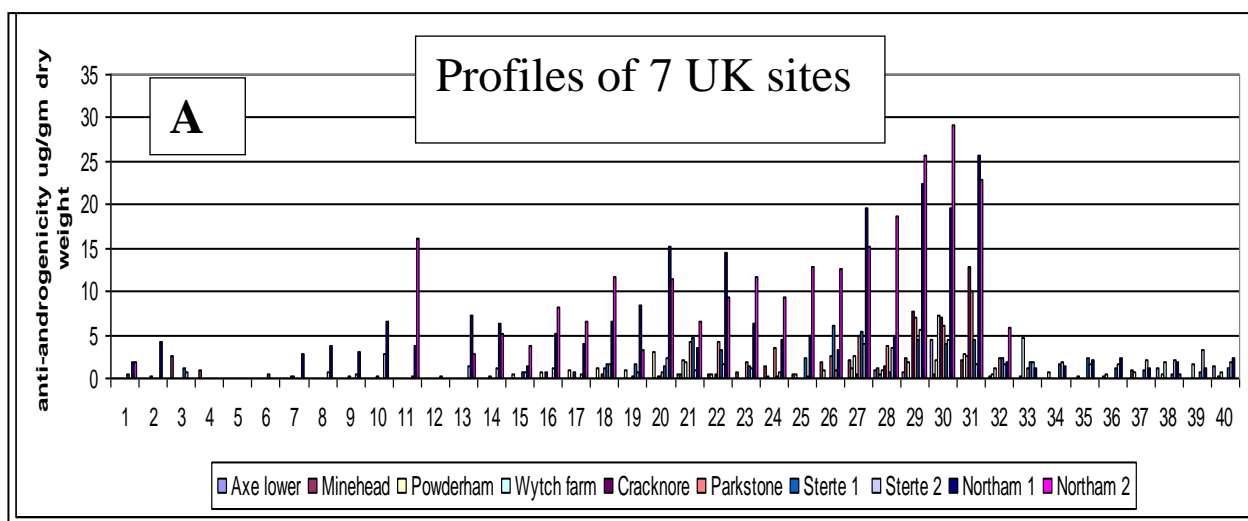
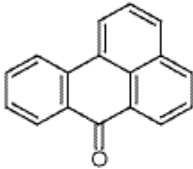
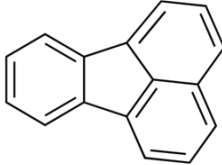
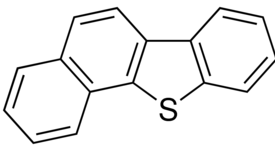
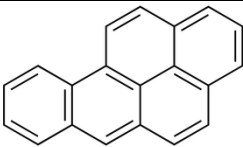
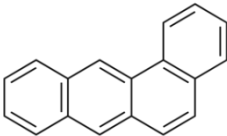
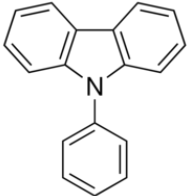


Figure 1: Profiles HPLC des activités anti-androgéniques des sédiments de A) sept sites anglais, B) de l'estuaire de Southampton à Northam et de C) la Seine à Rouen.

Table 1: Identités et structures de quelques composés anti-androgéniques identifiés dans les sédiments.

Nom	Structure	Formule	No CAS	Potentiel comparé au flutamide
Benzanthrone		C <sub>17</sub> H <sub>10</sub> O	82-05-3	0,413
Fluoranthrène		C <sub>16</sub> H <sub>10</sub>	206-44-0	0,955
1,2-benzodiphenylene sulfide		C <sub>16</sub> H <sub>10</sub> S	239-35-0	0,923
Benzo[a]pyrène		C <sub>20</sub> H <sub>12</sub>	50-32-8	0,966
Benz[a]anthracène		C <sub>18</sub> H <sub>12</sub>	56-55-3	1,271
9-phenylcarbazole		C <sub>18</sub> H <sub>13</sub> N	1150-62-5	0,326

### *Profils d'activités anti-androgéniques des extraits de scrobiculaires*

Les scrobiculaires montrant une féminisation importante de leurs organes reproducteurs (Langston et al., 2007 et partie 3 du rapport), il a semblé intéressant de vérifier le contenu d'extraits de mollusques en ce qui concerne la présence de composés anti-androgéniques. Les niveaux d'activité AA dans les scrobiculaires échantillonnées sur 4 sites de l'estuaire de Southampton ont été étudiés. Les sédiments du site de St Denys et de Northam ont des activités 5 à 20 fois plus fortes qu'à Woolston et Warsash (Fig. 2). Les activités AA dans les extraits de scrobiculaires mâles étaient significativement plus élevées ( $p < 0,05$ ) dans les sites de St Denys en comparaison avec Woolston, Warsash et Northam bien que cette différence n'était pas sensible chez les femelles.

Les profils d'activité des extraits de sédiments et de scrobiculaires ont été comparés (Fig. 3). Les profils d'anti-androgénicité des mollusques mâles et des femelles sont très semblables et similaires aux profils des extraits sédimentaires, à l'exception de trois fractions supplémentaires non

polaires éluant à 33, 34 et 38 minutes qui sont spécifiques des extraits de scrobiculaires. Les travaux sont en cours pour identifier ces composés.

Fait intéressant, les extraits de scrobiculaires mâles contiennent une fraction androgène très puissante (Fig. 4). A l'inverse, aucune activité androgénique n'a été trouvée dans les scrobiculaires femelles ou dans les échantillons de sédiments. Cela indique que les scrobiculaires mâles peuvent contenir des hormones androgènes naturelles. Une analyse en spectrométrie de masse a révélé que les extraits contenaient de la dihydrotestostérone (DHT), un puissant stéroïde androgène chez les mammifères et également été détecté chez d'autres mollusques (Janer et al., 2006). Ce résultat doit être confirmé, mais il suggère que les mollusques pourraient être sensibles aux composés à activité androgénique rendant encore plus plausible l'action des anti-androgènes détectés.

La poursuite des travaux devrait permettre de déterminer s'il existe un lien de causalité entre les activités AA des sédiments et l'intersexualité des scrobiculaires.

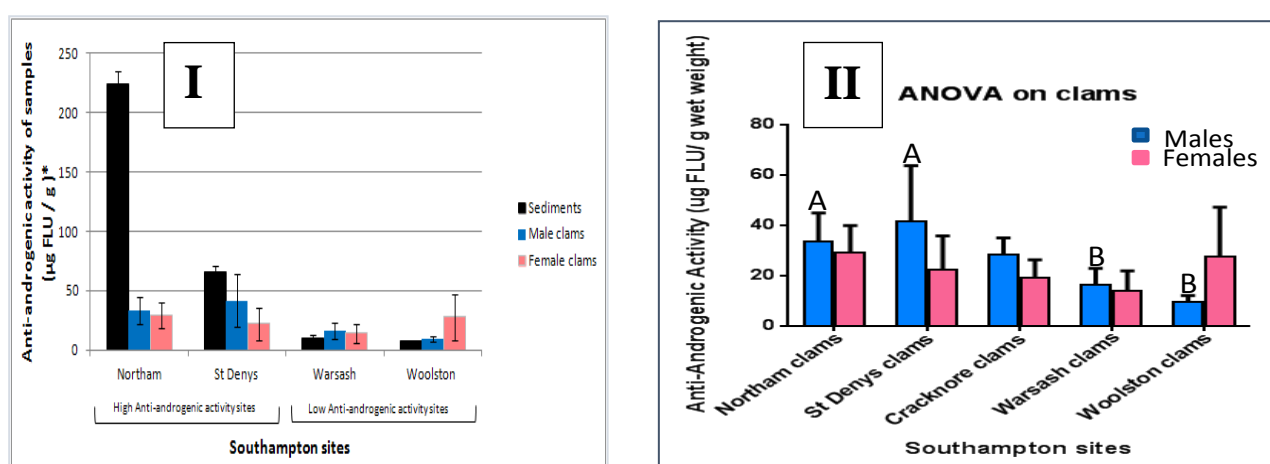


Figure 2: Activité anti-androgénique des extraits de tissus de scrobiculaires de l'estuaire de Southampton (en µg d'équivalents flutamide/g de tissu). (I) Concentrations dans les scrobiculaires et l'environnement. (II) Concentrations dans les scrobiculaires seules montrant les différences significatives entre les sites (pour les mâles) ( $p < 0.05$ ).

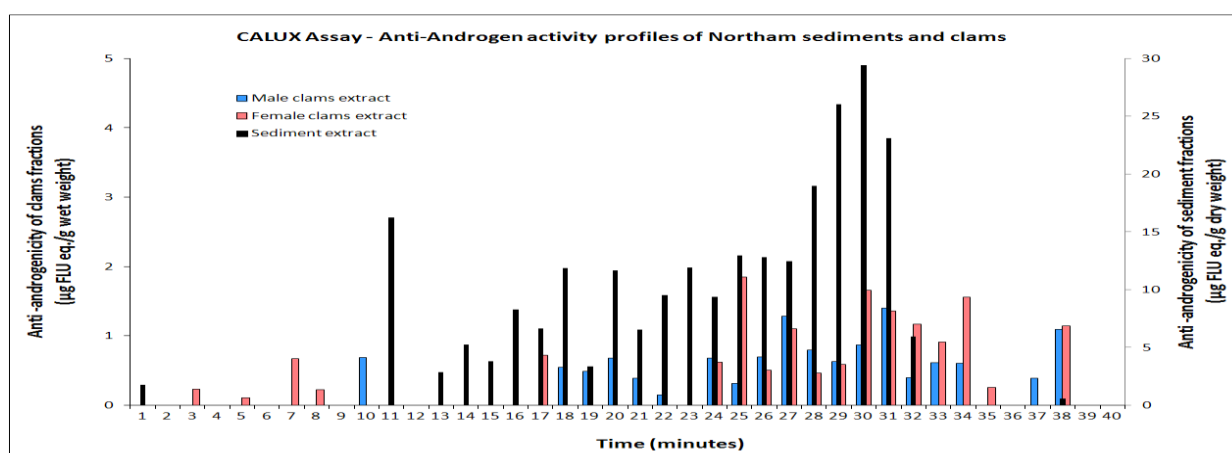


Figure 3 : Comparaison des profils HPLC des activités anti-androgéniques dans les extraits de sédiments et dans les extraits de scrobiculaires, mâles et femelles, provenant du site de Northam dans l'estuaire de Southampton.

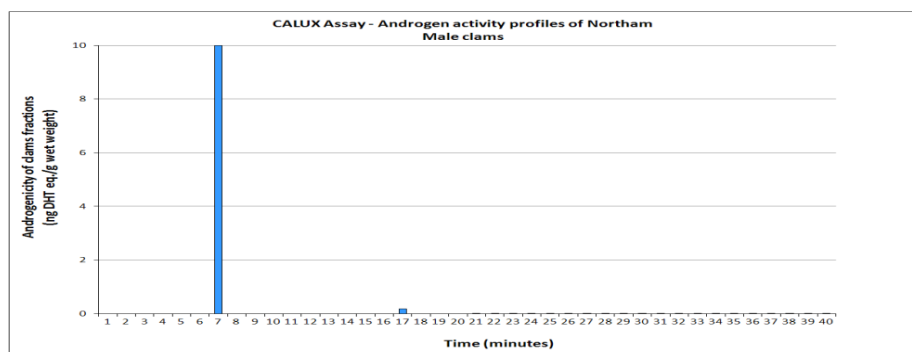


Figure 4. Profil de l'activité androgénique détectée dans un extrait de scrobiculaires mâles collectés à Northam. Aucune activité n'a été trouvée dans les extraits issus des tissus de femelles.

### II.3. Identification de perturbateurs endocriniens à l'aide de cultures d'explants de foie de gardon

De nombreux produits chimiques répandus dans l'environnement sont capables de perturber le système endocrinien des organismes vivants (Sumpter, 1998). Néanmoins, l'identification des molécules responsables et de leurs effets combinés sur les organismes est complexe et encore imparfaite. En conséquence, des tests écotoxicologiques ont été développés pour détecter et caractériser les perturbateurs endocriniens parmi les produits chimiques existants. Comme le milieu aquatique est le réceptacle final de nombreux contaminants, les espèces aquatiques et en particulier les poissons ont été souvent utilisés pour la biosurveillance de l'environnement. Le gardon (*Rutilus rutilus*), un cyprinidé, est un modèle de choix pour évaluer les effets des perturbateurs endocriniens et en particulier les effets de féminisation (Minier et al, 2000; Tyler, 2007). Parmi les différents biomarqueurs étudiés pour étudier la perturbation endocrinienne chez les poissons, la vitellogénine (VTG) sert de marqueur biologique fiable de l'exposition aux xéno-œstrogènes (Nilsen et al, 2004; Sumpter et Jobling, 1995; Kime et al, 1999.). La VTG est une phosphoglycolipoprotéine de poids moléculaire élevé et est un précurseur de la vitellin accumulée dans les œufs pour constituer la principale source d'énergie nécessaire au développement de l'embryon (Roubal et al., 1997). Elle est produite naturellement au cours de l'ovogenèse dans le foie des femelles adultes et transportée vers les gonades pour son incorporation dans les œufs. Sa synthèse est régulée par les œstrogènes endogènes comme le 17- $\beta$ -estradiol (E2) via les récepteurs aux œstrogènes. Comme la VTG peut être induite chez les mâles par des xéno-œstrogènes, l'induction de VTG reflète l'exposition environnementale aux substances chimiques œstrogéniques.

Récemment, les scientifiques ont été invités à réduire l'utilisation d'animaux vertébrés dans les tests toxicologiques pour des raisons éthiques. Conformément à ces exigences, d'autres méthodes, y compris des essais biologiques *in vitro* ont été développés (Walker et al., 1998). Bien que ces tests *in vitro* ne puissent pas remplacer les études *in vivo* sur animaux, ils peuvent permettre de mieux comprendre les mécanismes d'action des composés chimiques. Les avantages de tests *in vitro* sont leur reproductibilité, leur sensibilité et leur faible coût par rapport aux méthodes *in vivo*. Ainsi, la mesure de l'induction de VTG sur hépatocytes de poissons a été proposée comme un test d'identification des produits chimiques à activité œstrogéniques (Pelissero et al, 1993; Smeets et al, 1999). La culture d'explants apparaît aussi comme une alternative intéressante. Ils sont plus simples à préparer que les cultures d'hépatocytes et, en conservant la structure du foie, les cultures d'explants sont plus représentatives des conditions *in vivo* (Hurter et al., 2002). Ainsi, ils pourraient être utilisés pour évaluer le potentiel œstrogéniques ou anti-œstrogéniques des composés et de leurs métabolites (Navas et Segner, 2006).

L'objectif de cette étude était donc de développer un nouveau test *in vitro* pour évaluer l'activité œstrogéniques et anti-œstrogéniques potentielle de produits chimiques par la mesure de la synthèse de VTG. L'utilisation, pour la première fois, d'explants de foie gardon peut aider à documenter les effets observés *in situ* sur cette espèce particulière (Minier et al, 2000; Maltret-Géraudie et al, 2008).

#### *Mise en place de la culture des explants de foie*

Afin de réaliser les explants, des gardons matures ont été pêchés et anesthésiés. Le foie a été prélevé dans des conditions stériles avant d'être perfusé avec une solution de rinçage pour éliminer le sang. Des morceaux d'environ 3 mm<sup>3</sup> (5-20 mg), constituant les explants, ont alors été découpés et ont ensuite été placés dans des microplaques 24 puits avec un explant par puits. 1 ml de milieu de culture sans rouge de phénol et complété avec 1% de glutamine et 1% d'antibiotiques (pénicilline, la streptomycine et amphotéricine B) a été ajouté à chaque puits. Les plaques ont ensuite été incubées à 25 °C et maintenues sur un agitateur orbital (40 min) pour un maximum de 120 heures, prête pour les essais avec les produits chimiques. La viabilité cellulaire a été évaluée par la mesure de l'activité estérase non spécifique en utilisant du diacétate de fluorescéine (FDA) (Larsson et Nygren, 1989; Tutundjian et al, 2002) et la réponse œstrogéniques a été évaluée par des mesures de vitellogénine (VTG) dans le milieu de culture par dosage immuno-enzymatique. Les tests de viabilité cellulaire ont montré que la viabilité des explants incubés dans le milieu de culture était stable jusqu'à 72 heures.

#### *Activité œstrogéniques de produits chimiques environnementaux*

Une réponse dose-effet claire a été obtenue lors la stimulation de la production de VTG avec l'œstradiol (E2) pour 48, 72 ou 96 heures d'incubation (Fig. 5). La synthèse de VTG était détectable (0,2 ng.mL<sup>-1</sup>) à partir de 1 nM E2. Plusieurs polluants environnementaux connus ont alors été utilisés pour étudier leur potentiel œstrogénique relatif. Aucune réponse dose-dépendante n'a pu être établie pour le bisphénol A (BPA), le butylparaben (BP) et le 4-nonylphenol (NP) en raison de la cytotoxicité des composés (tableau 2). Après 48 heures d'exposition à 500 µM BPA, BP ou NP, l'hydrolyse de FDA n'a pas dépassé 0,49 FU.min<sup>-1</sup>.mg<sup>-1</sup> ce qui indique une cytotoxicité importante. Il n'y avait aucune induction de VTG mesurable après l'administration de 10 M pour tous les composés et des réponses significatives n'ont été obtenues qu'avec 100 µM (Fig. 6). Parmi les composés testés, le NP avait le plus faible potentiel œstrogénique avec une induction atteignant seulement 18,8% de celle obtenue avec 100 nM d'E2. Les réponses œstrogéniques enregistrées avec 100 µM de BPA ou de BP était significativement plus élevées qu'avec le NP. L'éthinyl-œstradiol (EE2) est le composé le plus œstrogénique avec une réponse en VTG significative mesurée à partir de 1 nm (Fig. 7). Les potentiels œstrogéniques des composés testés sont résumés dans le tableau 3.

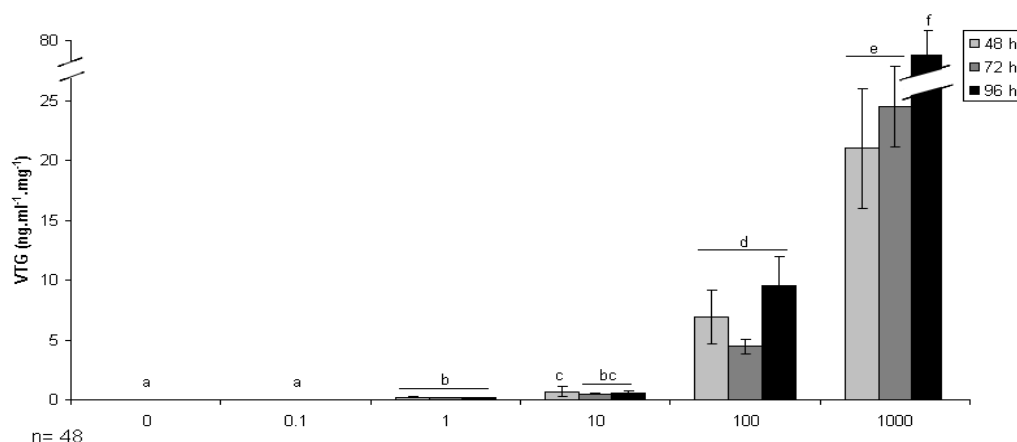


Figure 5: Concentration en VTG dosée dans le milieu de culture des explants après traitement des explants avec différentes concentrations d'œstradiol (E2) pendant 48, 72h et 96h. Les barres représentent les intervalles de confiance à 5%.



Tableau 2: Viabilité des explants mesurée par le test d'activité d'hydrolyse du FDA en (FU.min<sup>-1</sup>.mg<sup>-1</sup>) après exposition à différents composés : bisphénol A (BPA), butylparaben (BP), 4-nonylphenol (NP). Les résultats indiquent les moyennes  $\pm$  les intervalles de confiance. Les différentes lettres indiquent des différences significatives entre les groupes ( $p < 0.05$ ).

Concentration utilisée	Témoin	BP	BPA	NP
10 $\mu$ M	1.79 ( $\pm$ 0.34) <sup>a</sup>	0.96 ( $\pm$ 0.09) <sup>b</sup>	1.13 ( $\pm$ 0.50) <sup>ab</sup>	1.43 ( $\pm$ 0.83) <sup>ab</sup>
100 $\mu$ M	1.79 ( $\pm$ 0.34) <sup>a</sup>	1 ( $\pm$ 0.01) <sup>b</sup>	1.1 ( $\pm$ 0.50) <sup>ab</sup>	1.2 ( $\pm$ 0.51) <sup>ab</sup>
500 $\mu$ M	1.79 ( $\pm$ 0.34) <sup>a</sup>	0.05 ( $\pm$ 0.04) <sup>c</sup>	0.06 ( $\pm$ 0.003) <sup>c</sup>	0,49 ( $\pm$ 0.17) <sup>bc</sup>

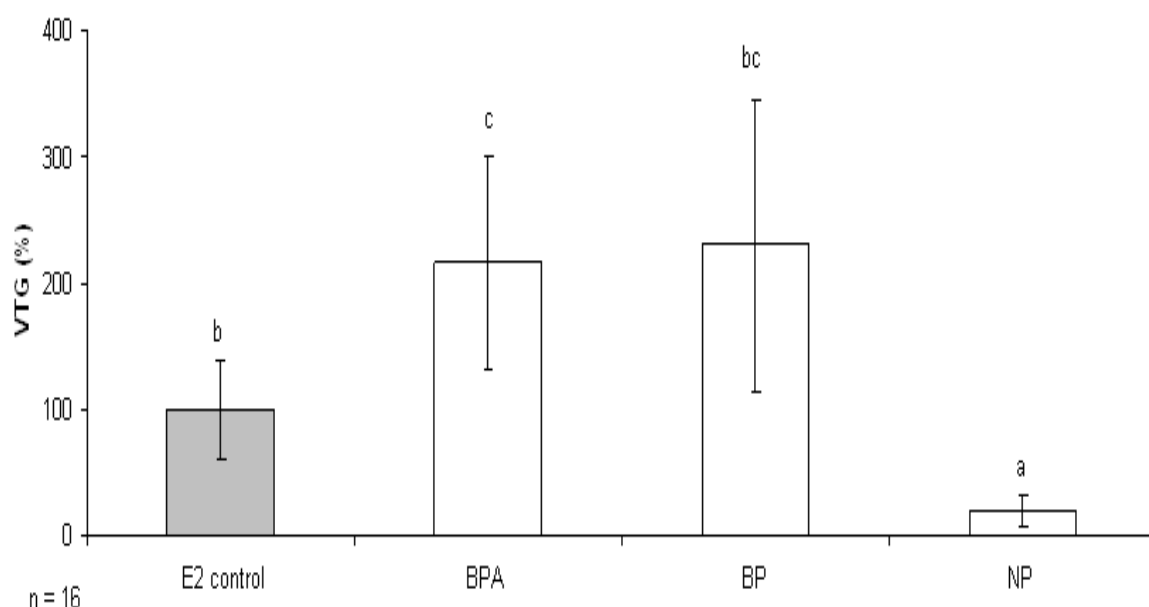


Figure 6: Concentrations en VTG induites ( en pourcentage du control) dans le milieu de culture des explants après traitement avec 100 nM d'E2 ou 100  $\mu$ M de bisphénol A (BPA), 100  $\mu$ M de butylparaben (BP) et 100  $\mu$ M de 4-nonylphénol (NP) pour 48 h à 20°C. Les barres représentent les intervalles de confiance à 5%. Les différentes lettres indiquent des différences significatives entre les groupes ( $p < 0.05$ ).

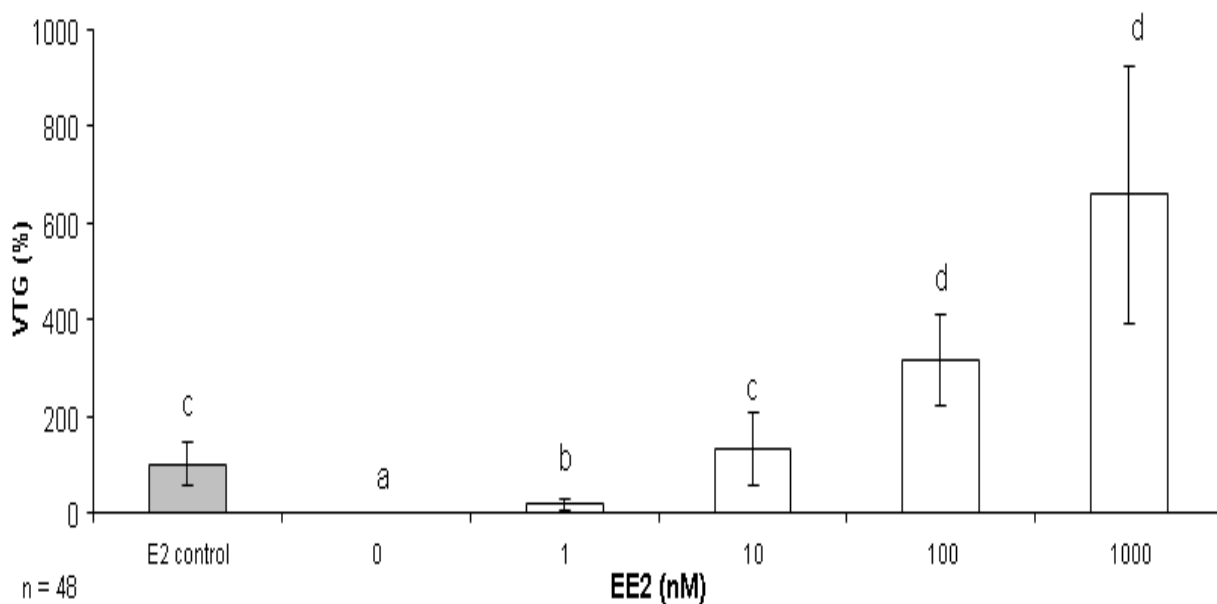


Figure 7: Concentrations en VTG induites (en pourcentage du control) dans le milieu de culture des explants après traitement avec du 17- $\alpha$ -éthinyloestradiol (EE2) pour 48 h à 20°C. Les barres représentent les intervalles de confiance à 5%. Les différentes lettres indiquent des différences significatives entre les groupes ( $p < 0.05$ ).

Table 3: Potentiel œstrogénique du 17- $\beta$ -estradiol (E2), 17- $\alpha$ -éthinyloestradiol (EE2), bisphénol A (BPA), butylparaben (BP) et du 4-nonylphénol (NP) calculé d'après l'induction de vitellogénine mesurée sur explants de foie de gardons.

Composé	potentiel œstrogénique
E2	1
EE2	10
BPA	0,01
BP	0,01
NP	0,0002

### Activité anti-œstrogénique

Afin de tester que les explants puissent être utilisés pour mesurer l'activité anti-œstrogénique, les explants ont été incubés simultanément avec de l'œstradiol et du tamoxifen, un composé anti-œstrogénique modèle (Cameron *et al.*, 2000). L'ajout de 0,1  $\mu\text{M}$  de tamoxifen associé à 100 nM d'E2 dans le milieu de culture a permis d'inhiber significativement la production de vitellogénine en comparaison de l'induction issue de la présence d'E2 seul (Fig. 8). 10  $\mu\text{M}$  de tamoxifen ont inhibé totalement l'effet œstrogénique de l'E2 dans les conditions du test.

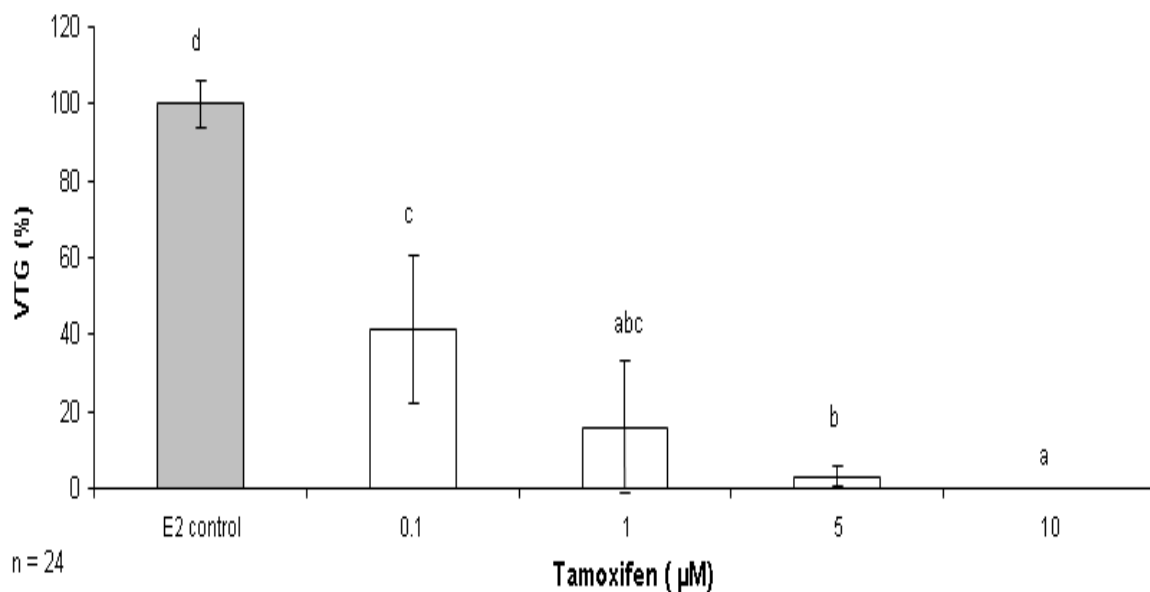


Figure 8: Concentrations en VTG induites (en pourcentage du control) dans le milieu de culture des explants après traitement avec différentes concentrations de tamoxifen associées à 100 nM E2 de 17- $\beta$ -œstradiol (E2) pour 48 h à 20°C. Les barres représentent les intervalles de confiance à 5%. Les différentes lettres indiquent des différences significatives entre les groupes ( $p < 0.05$ ).

### Conclusion

La culture des explants de foie gardon permet la réalisation de tests sensibles pour l'évaluation de l'activité œstrogénique ou anti-œstrogénique des composés chimiques. Les explants de foie fournissent un modèle réaliste *in vitro* car ils correspondent à un ensemble fonctionnel de cellules de foie permettant de tester les composés parents ou des mélanges et leurs métabolites.

### III. IDENTIFICATION DES MECANISMES DE TOXICITE

#### III.1. Introduction

Il est toujours très difficile de démontrer le rôle d'un composé chimique particulier dans un dysfonctionnement biologique sur les organismes sauvages présents dans l'environnement. En effet, de multiples facteurs peuvent concourir à une situation observée et l'action du composé n'est alors qu'un contributeur dont il est difficile de percevoir le degré d'implication. Cependant, le développement de connaissances sur les interactions du composé avec les composantes biologiques d'un organisme permettent de montrer la plausibilité de l'implication du composé en mettant en évidence un « mode d'action ». Ce mécanisme est très important car il permet de mesurer les altérations dont le composé peut être responsable et donc de tracer son éventuelle implication.

Afin d'identifier les mécanismes par lesquels un composé peut altérer une fonction biologique, il est essentiel de comprendre le fonctionnement « normal » des acteurs de cette fonction. Ces connaissances sont parfois incomplètes et il est alors nécessaire d'explorer et d'élucider les mécanismes endocriniens et immunitaires des organismes vivants. Cela est particulièrement vrai pour les invertébrés et notamment les mollusques étudiés dans ce projet. L'endocrinologie des mollusques est malheureusement encore mal comprise et est sensiblement différente des mécanismes beaucoup mieux connus des vertébrés (Ketata et al., 2008). Cependant de nombreuses zones d'ombre peuvent aussi être présentes dans les physiologies des vertébrés, particulièrement chez quelques espèces vivant dans les cours d'eau européen qui ne constituent pas les « organismes modèles » de laboratoire et qui ont pourtant été choisies dans ce programme car elles permettent d'apporter des informations sur le milieu où elles vivent, c'est-à-dire notre environnement.

Ce chapitre est donc dédié aux travaux qui ont permis d'approfondir à la fois nos connaissances sur les mécanismes physiologiques des organismes (en particulier endocriniens et immunitaires) et sur le mécanisme d'action des polluants.

Deux types d'organismes invertébrés ont été particulièrement étudiés dans ce programme DIESE : la moule *Mytilus edulis* et la scrobiculaire *Scrobicularia plana*. Le premier est un mollusque bivalve particulièrement étudié dans le cadre d'études environnementales et présent sur l'ensemble des côtes des zones d'étude du projet. Le second est aussi un mollusque bivalve bien réparti dans les estuaires de la zone d'étude. Il vit enfoui dans les sédiments et est affecté par des perturbations de la différenciation sexuelle au cours de la gamétogénèse donnant lieu à la présence de cellules des deux sexe au sein d'une même gonade et caractérisant le phénomène d'intersexualité (Langston et al., 2007).

Cinq espèces de poissons bien représentées dans la zone d'étude ont été particulièrement étudiées dans ce programme DIESE : le bar, *Dicentrarchus labrax*, et le flet, *Platichthys flesus*, pour la partie maritime, le gardon, *Rutilus rutilus*, le chabot, *Cottus cottus*, et l'épinoche, *Gasterosteus aculeatus*, pour la partie eaux douces. Mis à part le chabot, ces espèces sont déjà très étudiées et les travaux menés dans ce programme ont pu être conduits sur de bonnes bases. Le choix du chabot a été fait pour ses particularités pouvant permettre d'étudier un aspect précis des perturbations environnementales : les effets androgéniques.

Deux axes de recherches ont été suivis dans ce programme : l'étude des perturbations du système immunitaire et les perturbations du système endocrinien. Elles ont été poursuivies, dans le modèle flet, jusqu'à leur intégration au sein d'une étude multimarqueurs.

## III.2. Identifications des mécanismes endocriniens par une approche métabolomique et génomique chez la moule *Mytilus edulis*

### III.2.1. Introduction

Certains contaminants œstrogéniques dans le milieu aquatique sont associés à la féminisation des poissons mâles, mais leurs effets sur certaines espèces d'invertébrés, tels que les mollusques bivalves, n'ont pas encore été caractérisés. Le manque de connaissance est un obstacle évident à la mise en évidence d'effets des composés car, ne connaissant pas les mécanismes endocriniens à l'œuvre, nous ne pouvons les mesurer et en observer les perturbations. Afin de développer les connaissances et les indices biologiques pertinents, l'étude du métabolome, c'est-à-dire de l'ensemble des métabolites d'un individu est une approche à la fois exhaustive, sans a priori qui permet de suivre un très grand nombre de paramètres simultanément. En absence de connaissances, surveiller plusieurs milliers de paramètres permet potentiellement d'identifier ceux qui seront modifiés dans une situation particulière d'intérêt.

Cette approche a été mise en œuvre sur les échantillons de moules exposées à différentes doses d'un stéroïde, l'œstradiol (E2). Environ 10 000 signaux ont été mesurés par spectrométrie de masse pour chaque échantillon et certains ont permis de parfaitement différencier les conditions d'exposition des moules (Fig. 9). Parmi les signaux discriminants, certains ont pu être identifiés et permettent de développer des pistes d'étude et de proposer des mécanismes d'action des stéroïdes sur les mollusques. Ce fut le cas de prostaglandines et d'amines qui étaient différenciellement exprimées en présence et absence d'œstradiol et ont conduit à étudier certaines amines (5-HT) et les enzymes impliquées dans la synthèse des prostaglandines (COX).

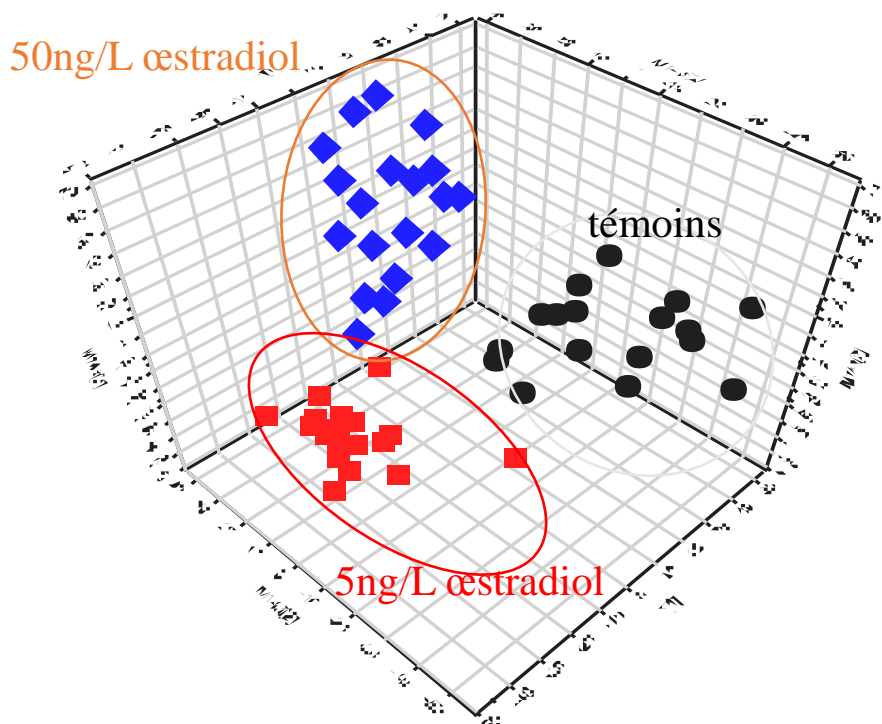


Figure 9 : Scores 3D PLS-DA des métabolites de gonades de moules femelles et males analysée en spectrométrie de masse. Les extraits ont été réalisés à partir de moules exposées à 0 (●) ; 5 (■) et 50 (◆) ng/L d'E2.

### III.2.2. Recherche de gènes impliqués dans la reproduction des mollusques

La gamétogenèse représente une étape cruciale dans le processus de reproduction et est soumise au contrôle hormonal de la sérotonine (5-HT), des prostaglandines (synthétisées par les cyclooxygénases, COX) et des stéroïdes comme le 17 $\beta$ -estradiol (E2). Nous avons examiné les réponses du récepteur 5-HT et l'expression du gène COX dans les moules, *Mytilus edulis*, exposées à des composés œstrogéniques au cours des différentes étapes de leur cycle de reproduction.

La sérotonine monoamine (5-HT) est un important médiateur de la reproduction. Des administrations de 5-HT induisent la ponte chez les bivalves (Matsutani et Nomura, 1982; Gibbons et Castagna, 1984; Matsutani et Nomura, 1987 ; Ram et al, 1993). En outre, les niveaux de 5-HT diminuent après la ponte dans les gonades des pétoncles hermaphrodites, *Argopecten purpuratus* (Martinez et Rivera, 1994 ; Martinez et al, 1996) supportant l'hypothèse d'une implication des mécanismes monoaminergiques au cours des processus de frai. Certaines études ont indiqué que les œstrogènes potentialisent le frai induit par le 5-HT (Osada et al, 1992; Wang et Croll, 2006) qui peut être atteint grâce à une induction de la formation de récepteurs au 5-HT (Osada et al, 1998). La 5-HT est également impliquée dans la différenciation sexuelle. Pendant la phase de différenciation sexuelle, des niveaux élevés de E2 et des niveaux inférieurs de 5-HT se trouvent dans les tissus cérébraux femelles des poissons *Oreochromis mossambicus* par rapport aux niveaux trouvés dans les cerveaux masculins (Tsai et al., 2000). Cette relation inverse de la 5-HT et E2 a également été décrite dans la pétoncle *A. purpuratus* (Martinez et Rivera, 1994).

Le but de cette étude était d'examiner les changements dans l'expression génique relative de COX et de 5-HT dans la moule, *M. edulis* exposée aux œstrogènes. Ces changements ont été analysés en premier dans les moules matures exposées à E2 et, dans une seconde expérience, sur des moules en début du cycle de reproduction. Les œstrogènes utilisées ont été E2, l'éthinyl-œstradiol (EE2) et le benzoate d'œstradiol (EB).

Les résultats ont permis de montrer que les niveaux d'expression des récepteurs 5-HT et des enzymes COX sont différents chez les mâles et les femelles, indiquant un rôle particulier selon le sexe et confirmant une implication des voies étudiées dans la régulation liée au sexe. De plus les résultats montrent que des concentrations écologiquement pertinentes de l'œstrogène naturel, E2, ainsi que de l'œstrogène synthétique, EE2, induisent des modifications, dans les niveaux d'expression des récepteurs 5-HT et / ou COX chez la moule. En particulier E2 diminue le niveau d'expression des enzymes COX chez les femelles alors que le stéroïde est sans effet sur les mâles (Fig. 9). Concernant l'expression du récepteur 5-HT, l'exposition à E2 entraîne une diminution de l'expression du gène chez les mâles et les femelles matures. A l'inverse, cette exposition en début de gamétogenèse engendre une augmentation très forte de l'expression du récepteur (Fig. 10).

Ces résultats indiquent que des paramètres endocriniens importants pour la reproduction des mollusques peuvent être modifiés par l'exposition à des œstrogènes et permettent ainsi de proposer une première voie d'action des stéroïdes concernant les perturbations de la reproduction parfois observées en milieu naturel (Blaise et al., 2003 ; Gauthier-Clerc et al., 2006) . La différence d'action selon le stade de développement sexuel est un résultat confirmant la difficulté d'appréhender les risques liés aux perturbateurs endocriniens puisque les effets ne dépendent pas seulement de la dose mais aussi de la fenêtre d'exposition.

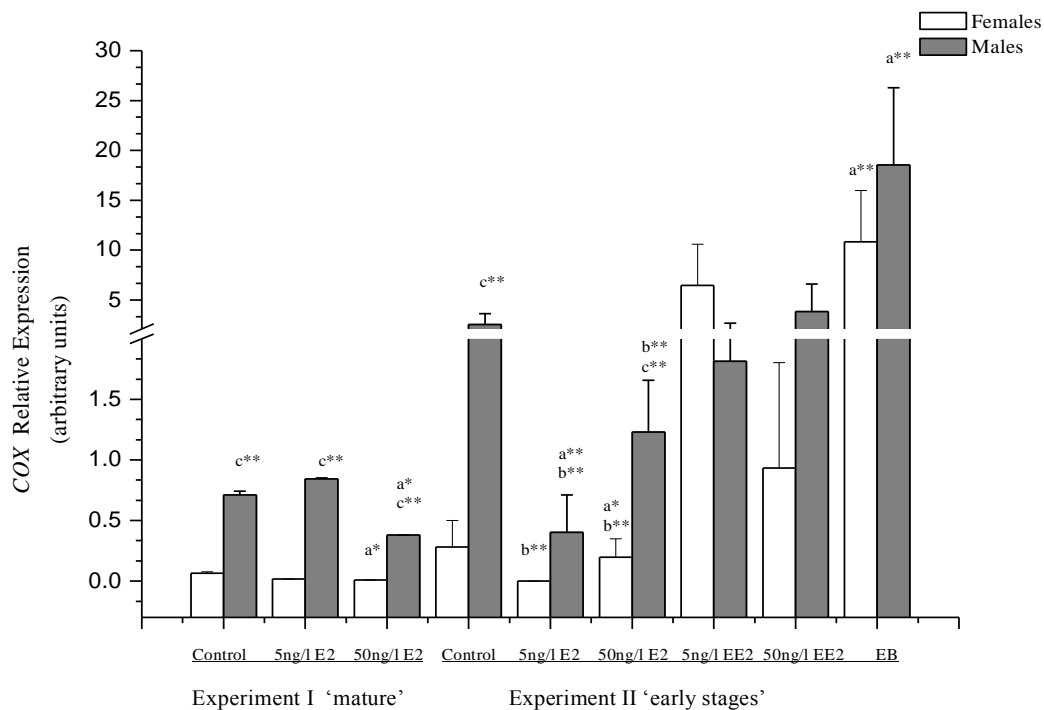


Figure 10 : Niveaux d'expression du gène *COX* chez des moules femelles et males matures (mature) ou en début de gamétogénèse (early stage) exposées à 5 ng/l et 50 ng/l d'E2 et d'EE2 et 200 ng/l d'E2-B. Les moyennes sont indiquées  $\pm$  SEM. La présence de différences significatives est indiquée par les astérisques \*\*:  $p < 0.01$ , \* :  $p < 0.05$ .

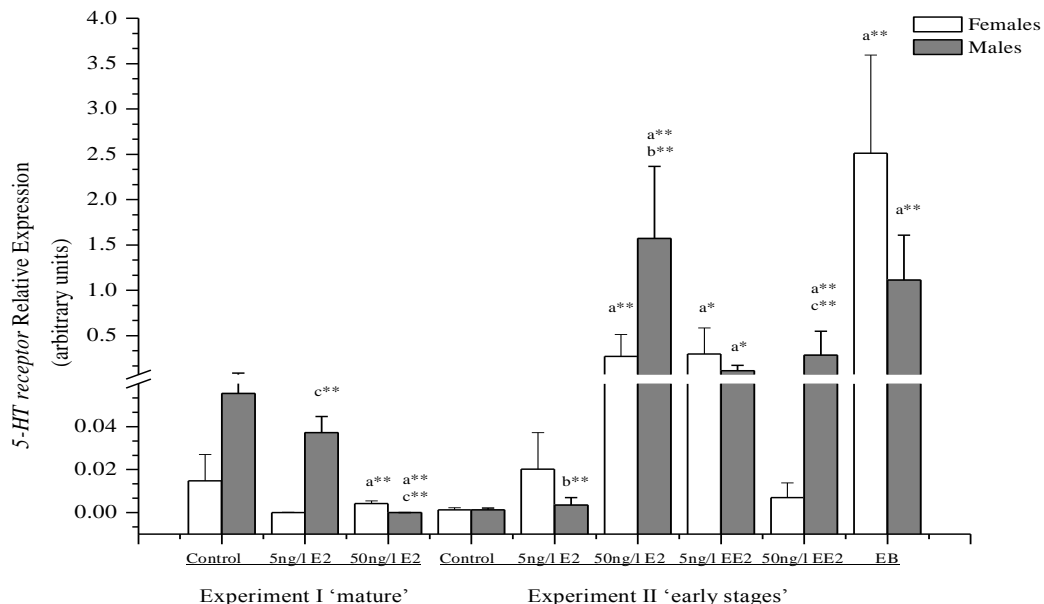


Figure 11 : Niveaux d'expression du gène codant pour le récepteur de la sérotonine (*5-HT*) chez des moules femelles et males matures (mature) ou en début de gamétogénèse (early stage) exposées à 5 ng/l et 50 ng/l d'E2 et d'EE2 et 200 ng/l d'E2-B. Les moyennes sont indiquées  $\pm$  SEM. La présence de différences significatives est indiquée par les astérisques \*\*:  $p < 0.01$ , \* :  $p < 0.05$ .

Les investigations se sont poursuivies par la recherche d'enzymes permettant de métaboliser les stéroïdes dont l'action avait été mise en évidence précédemment. Les cytochromes P450 (CYP) correspondent à une superfamille comprenant des protéines impliquées dans le métabolisme oxydatif (biotransformation de phase I) de composés endogènes et des xénobiotiques, y compris des stéroïdes et des polluants environnementaux. Les enzymes de la sous-famille CYP3A catalysent l'hydroxylation de la testostérone à la position 6 $\beta$  (Arukwe et Goksøyr, 1997) et métabolisent un large éventail de composés organiques lipophiles tels que des polluants environnementaux, des médicaments et des stéroïdes (revue de Maurel, 1996).

Les protéines CYP3A ont été caractérisées principalement chez les mammifères et d'autres espèces de vertébrés, y compris des poissons, (revue de Schlenk et al., 2008). Chez les invertébrés, des gènes homologues ont été décrits dans l'ascidie *Ciona spp.* (Verslycke et al., 2006) et, plus récemment, dans le moule *Mytilus californianus* (Zanette et al., 2010). La réactivité croisée avec des anticorps spécifiques pour les vertébrés suggère également que les protéines de type CYP3A sont présentes dans la glande digestive de *M. edulis* et de *M. galloprovincialis*. (Peters et al, 1998; Shaw et al, 2004). Les protéines CYP3A de vertébrés sont principalement exprimées dans le foie et l'intestin suggérant que ces enzymes ont un rôle dans le métabolisme de premier passage des xénobiotiques. Chez le killifish, *Fundulus heteroclitus*, une expression extra-hépatique a été observée dans les branchies, le rein, le cerveau, la rate et l'ovaire, ce qui suggère que les enzymes sont également impliquées dans la régulation des niveaux de substrats endogènes (Hegelund et Celander, 2003).

Nous avons isolé et caractérisé deux nouveaux gènes de type CYP3A à partir de tissu gonadique de *M. edulis* (GenBank AB479539 et GenBank AB479540). Afin d'identifier si les polluants environnementaux sont des cibles potentielles pour ces gènes, les niveaux d'expression en ARNm ont été étudiés dans les gonades de moules matures exposées au 17 $\beta$ -estradiol (E2), au tributylétain (TBT) et à des extraits d'effluents de station de traitement des eaux usées. L'analyse chimique des concentrations tissulaires d'estradiol et d'étain libre et total ont été effectuées en parallèle pour confirmer l'absorption. En outre, le dimorphisme sexuel et la variation naturelle du CYP3A comme l'expression des isoformes ont été étudiée chez les sujets à différentes périodes de leur cycle de reproduction (Fig. 12 et 13).

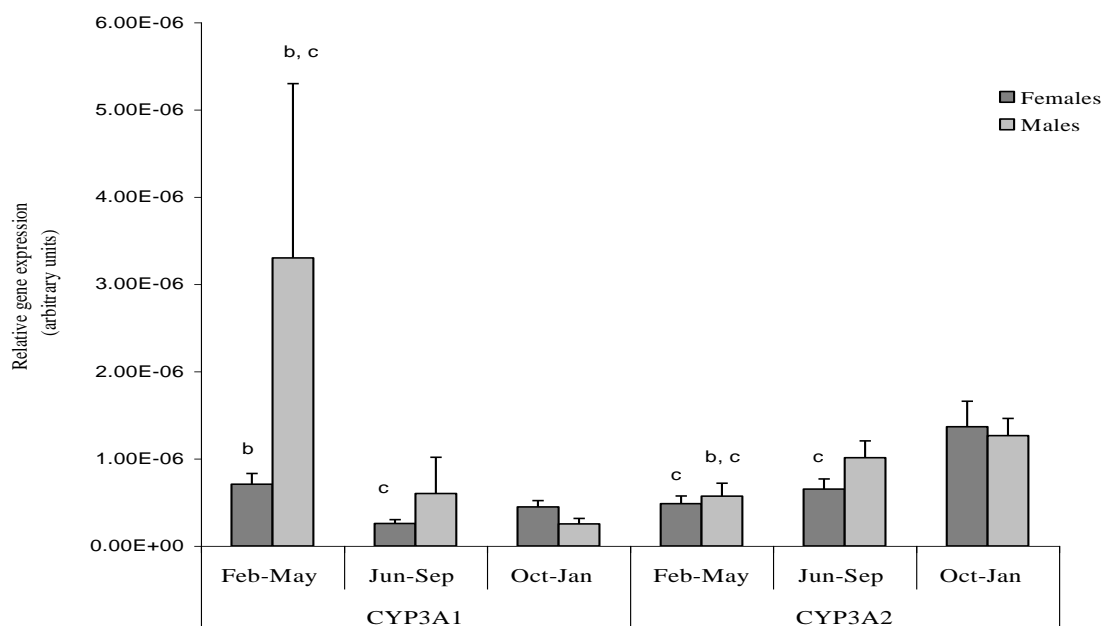


Figure 12 : Niveaux d'expression des deux isoformes de *CYP3A* en fonction du cycle annuel.



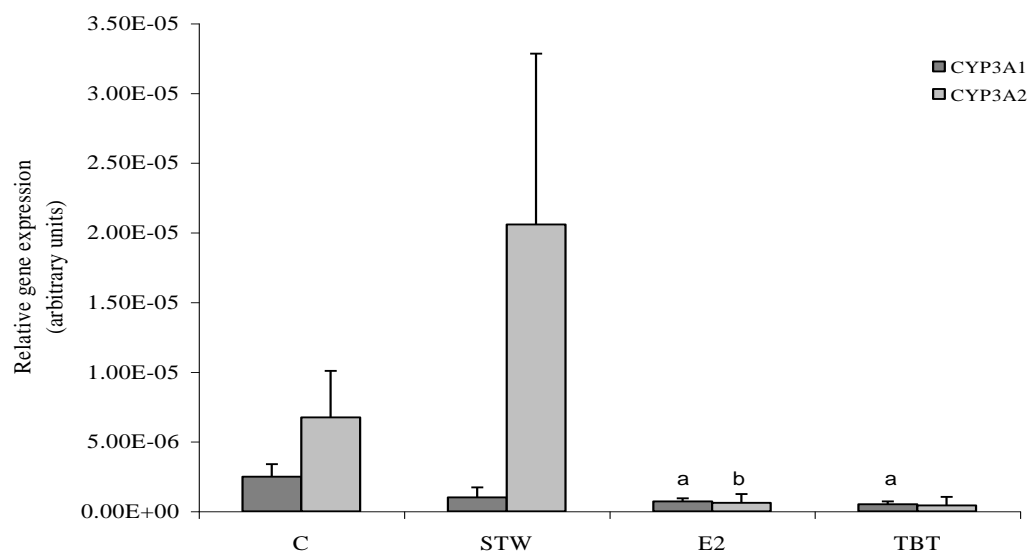


Figure 13 : Niveaux d'expression des deux isoformes de *CYP3A* en fonction de l'exposition à E2 (200 ng/l), TBT (100 ng Sn/l) and d'effluent de station d'épuration (STW).

Les résultats montrent que les variations saisonnières sont différentes selon les isoformes, suggérant qu'elles peuvent jouer des rôles particuliers dans la physiologie des moules. Les niveaux d'expression de l'isoforme 1 dans les gonades de moules ont été modulés par l'E2 et le TBT. Concernant l'isoforme 2, les effets ont été très importants sous l'action de composés présents dans les effluents de station d'épuration.

#### III.2.1.3. Etude de l'implication des stéroïdes dans le cycle reproducteur de la moule *M. edulis*

Les effluents municipaux et industriels traités et non traités ainsi que les rejets de l'élevage ou d'autres pratiques agricoles sont les principales sources de contamination hormonale des milieux aquatiques (Matozzo et al., 2008). L'œstradiol (E2) est l'œstrogène naturel le plus actif biologiquement, tandis que les dérivés synthétiques comme l'éthinylestradiol (EE2) et l'estradiol benzoate (EB) sont utilisés, respectivement, dans la formulation des contraceptifs, les traitements des troubles de la ménopause ou de la reproduction de l'élevage domestique. Les concentrations d'E2 relevées à proximité des installations de traitement des eaux usées varient de 2,7 ng/l à près de 50 ng/l dans les rivières britanniques. De nombreux travaux ont été réalisés pour évaluer les effets d'E2 et de EE2 sur les bivalves (Canesi et al, 2007; Canesi et al, 2008; Wessel et al, 2007; Quinn et al, 2004). Par contre, on connaît moins les effets d'EB, en particulier dans les organismes marins. EB est un analogue de l'œstradiol, qui contient un ester de benzyle en position C-3. Il est couramment utilisé dans les cheptels bovins pour stimuler l'œstrus et l'ovulation et également pour la prévention et le traitement de nombreuses maladies post-partum. Seul, Mori (1969) fait état d'une accélération de la maturation sexuelle et de l'incidence d'intersexuées chez *C. gigas* après exposition pendant 10-14 jours à EB.

Au cours de précédentes études, nous avons signalé qu'aucun changement des niveaux d'expression de vitellogénine (VTG) ou de récepteur à l'œstradiol (ER1 ou ER2) ne résultait de l'exposition de moules sexuellement matures à E2 (Puinean et al. 2006). Cependant, nos travaux ayant aussi montré que la sensibilité des organismes peut être différente selon les stades de maturation, une seconde expérimentation sur des moules en début de gamétogénèse a été menée.

Les résultats montrent que, si pour des moules matures, aucune différence statistiquement significative n'est mesurable concernant les niveaux d'expression d'ARNm de VTG ou de ER après 10 jours d'exposition à E2 (5, 50 et 200 ng / l), en revanche, les moules à un stade précoce de développement montrent des réponses dose-dépendantes (Fig. 14 et 15). Ces résultats suggèrent l'existence d'un mécanisme de régulation pour la signalisation de l'œstrogène, qui varie selon le cycle de reproduction (Zhu et al., 2003).

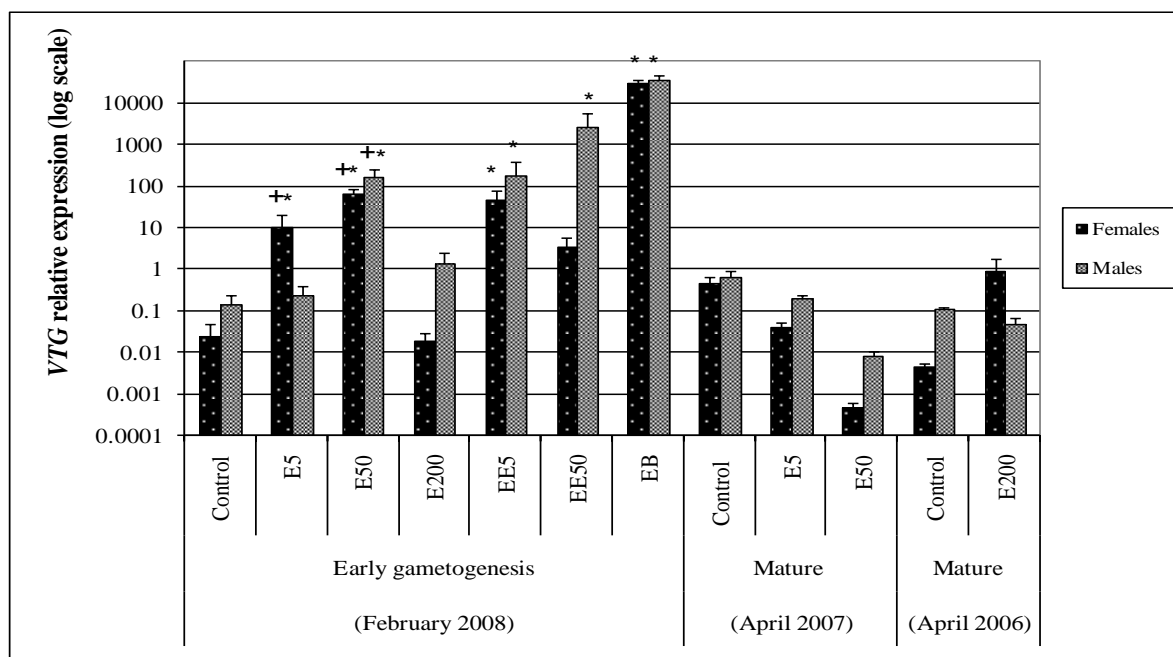


Figure 14 : Niveaux d'expression relatifs de messagers de VTG dans les gonades de la moule *M. edulis* au début (early) ou en fin de la gamétogénèse (late gametogenesis). C=témoins; E5=moules exposées à 5 ng/l E2; E50= moules exposées à 50 ng/l E2; E200= moules exposées à 200 ng/l E2; EE5= moules exposées à 5 ng/l EE2; EE50= moules exposées à 50 ng/l EE2; EB= moules exposées à 200 ng/l EB. Les barres indiquent les valeurs moyennes  $\pm$  SEM. n=10. Les traitements marqués d'un \* sont significativement différents ( $P < 0.05$ ) des témoins non traités. Les traitements marqués d'un + sont significativement différents de leur équivalents matures. Les traitements marqués d'un ^ sont significativement différents de leur équivalent de sexe différent.

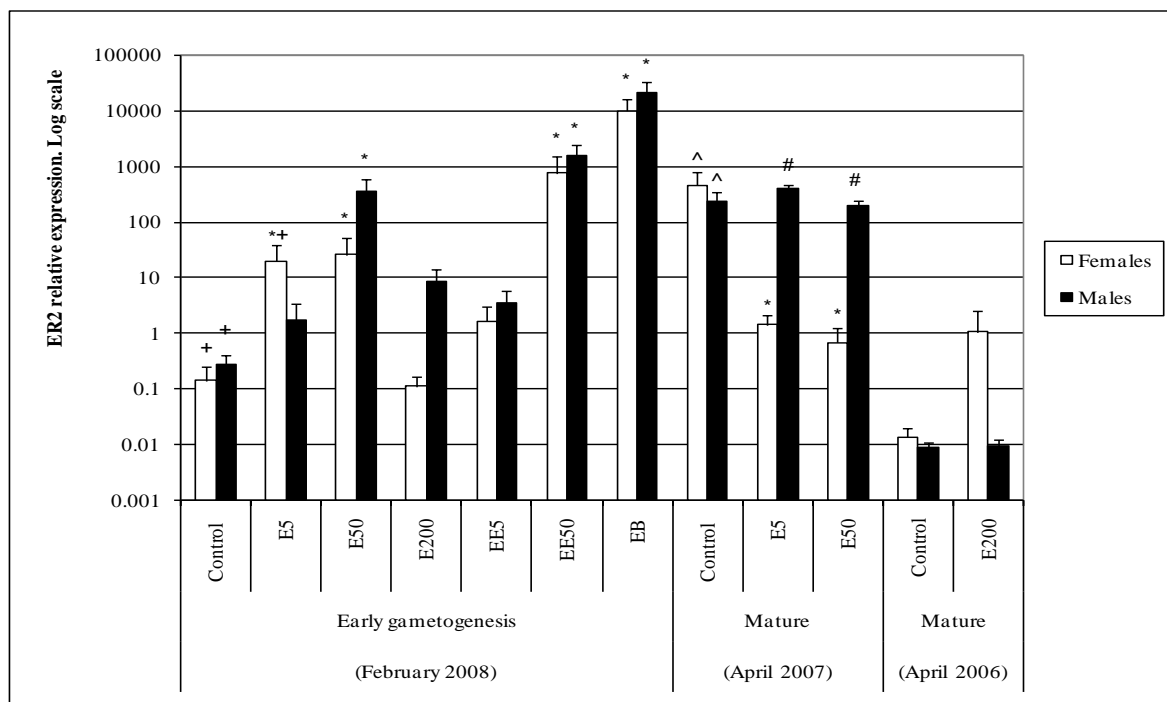


Figure 15 : Niveaux d'expression relatifs de messagers de *ER2* dans les gonades de la moule *M. edulis* au début (early) ou en fin de la gamétogénèse (late gametogenesis). C=témoins; E5=moules exposées à 5 ng/l E2; E50= moules exposées à 50 ng/l E2; E200= moules exposées à 200 ng/l E2; EE5= moules exposées à 5 ng/l EE2; EE50= moules exposées à 50 ng/l EE2; EB= moules exposées à 200 ng/l EB. Les barres indiquent les valeurs moyennes  $\pm$  SEM. n=10. Les traitements marqués d'un \* sont significativement différents ( $P<0.05$ ) des témoins non traités. Les traitements marqués d'un + sont significativement différents de leur équivalents matures. Les traitements marqués d'un ^ sont significativement différents de leur équivalent de sexe différent.

Les précédents résultats confortent les observations faites quant aux niveaux d'expression de la sérotonine, de la COX et de la CYP3A en indiquant une possible implication de stéroïdes dans les phénomènes de maturation sexuelle chez la moule. Ensemble, ces données suggèrent que les œstrogènes peuvent avoir un impact sur les processus de reproduction chez les bivalves. En s'appuyant sur ces observations, le but de notre prochaine étude était d'adopter une approche exploratoire pour identifier de nouveaux gènes exprimés de manière différentielle dans le processus de maturation et de la réponse de l'œstrogène chez le bivalve marin, *M. edulis*.

De nouvelles techniques moléculaires (SSH = suppressive hybridation soustraction) ont été utilisés pour mettre en évidence les voies cellulaires affectées par l'exposition aux œstrogènes, puis, en ciblant les gènes clés impliqués dans ces voies, des mesures ont été effectuées afin d'apprécier le potentiel de ces indicateurs biologiques pour alerter sur les possible altérations du système endocrinien des bivalves. L'utilisation de la SSH sur des échantillons de gonades moules à différents stades de la gamétogénèse et (en parallèle) après une exposition contrôlée à des œstrogènes a permis d'identifier plusieurs gènes régulés de façon différentielle, y compris un gène associé au récepteur des androgènes, une lysine de la vitelline et une séquence d'enveloppe vitelline (Tables 4 et 5). Ces séquences donnent une nouvelle orientation permettant de comprendre le rôle des hormones stéroïdes sexuelles dans les organismes invertébrés et offre une voie d'identification des perturbations endocriniennes.

Table 4 : Liste des gènes différentiellement exprimés dans les testicules de *M. edulis* à différents stades du cycle reproducteur.

Category/gene identity	Length	Homologue species
<i>Protein binding/Apoptosis/Cell cycle</i>		
Complement C1q like protein	111	<i>Ailuropoda melanoleuca</i>
Alpha tubulin	297	<i>C.gigas</i>
Beta tubulin	501	<i>Rattus norvegicus</i>
Ribosomal protein L7	240	<i>C.gigas</i>
Bromodomain adjacent to zinc finger protein	369	<i>G.gallus</i>
Elongation factor 1 gamma	162	<i>Saccoglossus kowalevskii</i>
Ferritin like protein	492	<i>Pinctada fucata</i>
Senescence associated protein	318	<i>Trichoplax adhaerens</i>
Spectrin beta chain	293	<i>Harpegnathos saltator</i>
Vitelline envelope zona pellucida domain 9	900	<i>Halotis rufescens</i>
<i>Signalling</i>		
C1q domain containing protein	141	<i>Argopecten irradians</i>
Rwd domain containing protein 4A (small androgen receptor)	240	<i>Caligus regercresseyi</i>
<i>Electron transport</i>		
Hemagglutinin/amebocyte aggregation factor precursor	240	<i>Salmo salar</i>
Cytochrome c oxidase subunit II	448	<i>M.edulis</i>
NADH dehydrogenase subunit I	647	<i>M.edulis</i>
Triosephosphate isomerase TIM	156	<i>Metapaeneus ensis</i>
Cytochrome c oxidase subunit I	534	<i>M.edulis</i>
Cytochrome b	302	<i>M.edulis</i>

Six ARNm cibles ont été choisis pour la validation par PCR quantitative (qPCR) des résultats d'expression différentielle en SSH (Fig. 16 et 17). La lysine vitelline et la lectine de liaison à l'acide sialique sont statistiquement régulés différemment en fonction du stade de maturité des testicules, (plus importants dans les testicules matures). Inversement, la sérine/thréonine kinase 1 testiculaire (TSTK1) et le récepteur aux œstrogènes (ER) sont significativement réprimés dans les testicules matures. L'expression de l'ARNm du cytochrome b est statistiquement diminuée chez les moules exposées à E2 en comparaison des échantillons contrôles, et la RWD contenant le domaine 4A est statistiquement diminuée chez les moules matures, ce qui confirme encore une fois le résultat de la SSH.

Table 5 : Liste des gènes différentiellement exprimés dans les testicules de *M. edulis* après exposition à 50ng/l E2.

Clone accession no.	Category & gene identity	Length (bp)	Homolog species /Accession no.	E-value
Down-regulated in early developing testes relative to mature testes				
Cellular component/Apoptosis/Cell cycle				
HQ690234	Senescence-associated protein	155	<i>Brugia malayi</i> XP_001900327.1	$5.0E^{-10}$
AJ492924.1	Histone 2A	301	<i>M. edulis</i> AJ492924.1	$1.0E^{-108}$
AY484747.1	16S ribosomal protein	931	<i>M. edulis</i> AY484747.1	0
Signalling				
FM995162.1	Vitelline coat lysin M7 precursor	635	<i>M. edulis</i> BAA03551.1	$3.0E^{-123}$
HQ678182	Sialic acid binding lectin	397	<i>Helix pomatia</i> ABF00124.1	$4.0E^{-15}$
Up-regulated in early developing testes relative to mature testes				
Cell cycle/Spermatogenesis				
HQ678180	Testis-specific serine/threonine kinase 1 (TSTK1)	815	<i>Strongylocentrotus purpuratus</i> <a href="#">XP_787865.1</a>	$4.0E^{-70}$
HQ678181	Testis-specific A-kinase-anchoring-protein	182	<i>Gallus gallus</i> XP_002162537.1	$9.0E^{-6}$
HQ67816	Histone H2A isoform 2	332	<i>Haliotis discus discus</i> ACJ12611.1	$1.0E^{-53}$
HQ678184	Beta-tubulin	511	<i>C. gigas</i> AAU93877.1	$9.0E^{-81}$
Signalling				
AB257133	ER	111	<i>M. edulis</i> BAF34366.2	$1.0E^{-12}$
HQ678183	Bindin precursor 5 repeat variant (acrosomal protein)	392	<i>C. gigas</i> ABQ18234.1	$7.0E^{-14}$
HQ678185	Phosphodiesterase 1	533	<i>S. purpuratus</i> NP_001091918.1	$5.0E^{-62}$
Mitochondrial electron transport				
AY130198.1	Cytochrome c oxidase subunit III	254	<i>M. edulis</i> AAV68300.1	$2.0E^{-31}$

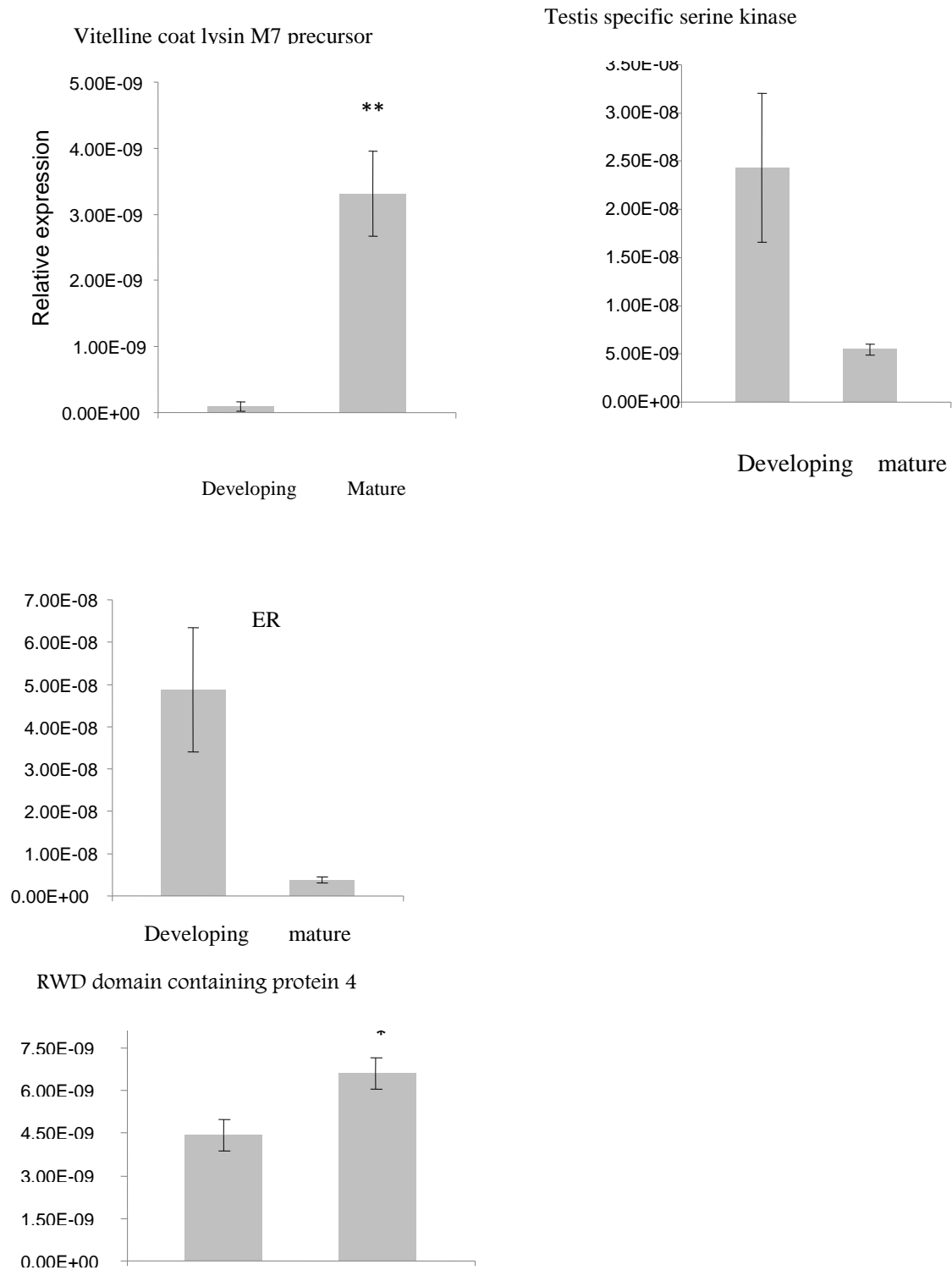


Figure 16 : Niveau d'expression de gènes sélectionnés chez des moules matures et en voie de développement. Moyenne  $\pm$  SEM, n=15.  $*=p<0.05$ ;  $**=p<0.01$ .

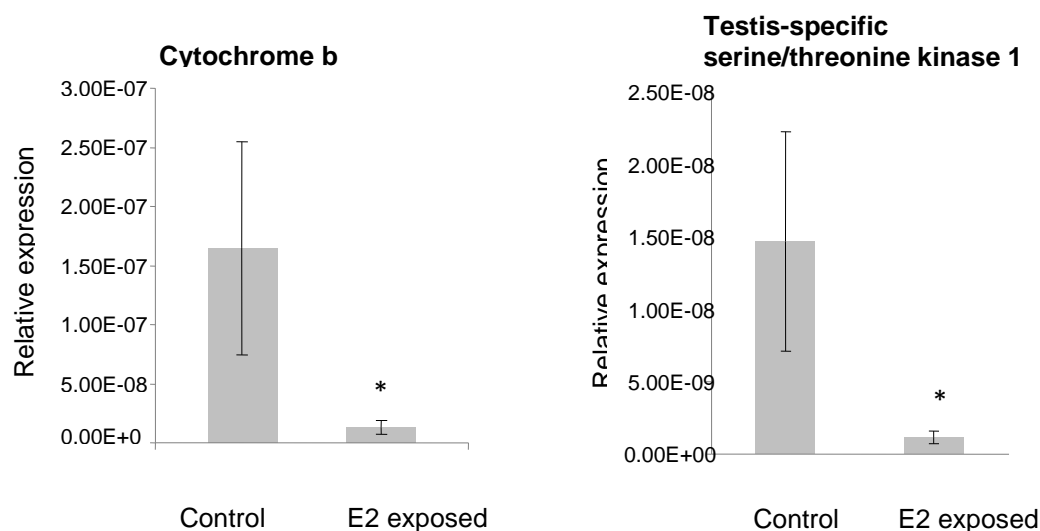


Figure 17 : Niveau d'expression de gènes sélectionnés chez des moules exposées ou non à E2. Moyenne  $\pm$  SEM, n=15. \*= $p < 0.05$ ; \*\*= $p < 0.01$ .

Nos résultats indiquent que les stéroïdes, en particulier les stéroïdes sexuels, jouent un rôle important dans le contrôle de la reproduction des moules. Par exemple, il apparaît que les processus régulés par la testostérone peuvent être contrôlés par des mécanismes supplémentaires, impliquant des protéines interactives avec le récepteur (c'est-à-dire RWD), tandis que certaines actions sont probablement relayées par les récepteurs. En conclusion, nos données concernant l'expression des gènes au cours du développement spermatogénétique et la perturbation endocrinienne induite expérimentalement donnent des informations nouvelles sur les aspects non définies auparavant des voies de reproduction des mollusques. Nous avons trouvé quarante-sept gènes potentiels dont l'abondance de messagers fluctue en coïncidence avec les processus de perturbation de développement et l'endocrinologie du testicule. Les données obtenues permettent une meilleure compréhension de la spermatogenèse des moules et constituent une nouvelle orientation pour les endocrinologues des invertébrés dans la planification de nouvelles expériences.

### III.3. Identification de voies cellulaires conduisant à la féminisation des scrobiculaires mâles (*Scrobicularia plana*)

Dans certaines parties de la région Manche, une forte incidence de scrobiculaires, *Scrobicularia plana*, intersexuées a été observée (voir partie 3 du présent rapport), mais les causes ne sont pas connues. Contrairement aux vertébrés, la détermination du sexe et la différenciation chez les bivalves marins dépendent moins des chromosomes sexuels et plus des hormones et des facteurs environnementaux. Les études sur les effets complexes des perturbateurs endocriniens sur les bivalves font un progrès lent, en partie à cause d'une mauvaise compréhension des mécanismes régissant la reproduction. Principalement en raison de son habitat estuarien, *S. plana* est très sensible aux œstrogènes, mais les mécanismes de ces effets étaient, avant nos travaux, inexplorés.

La méthode SSH a été utilisée pour identifier les transcrits exprimés de manière différentielle dans les gonades des scrobiculaires adultes présentant divers degrés d'intersexualité. Plusieurs transcrits d'ARNm intéressants ont été identifiés et validés et apparaissent réprimés dans les échantillons intersexués. Ceux-ci codent pour une variété de protéines impliquées dans la signalisation

cellulaire (RACK1), le cycle cellulaire (PCNA, histone H3), la synthèse des protéines (protéines ribosomiques), le cytosquelette (tektin), la physiologie du sperme (tektin, SPL1) et le métabolisme énergétique (CYB, COX-1). Dans plusieurs cas, la réponse a été plus de 10 fois inférieure à celle des mâles témoins (fig. 18).

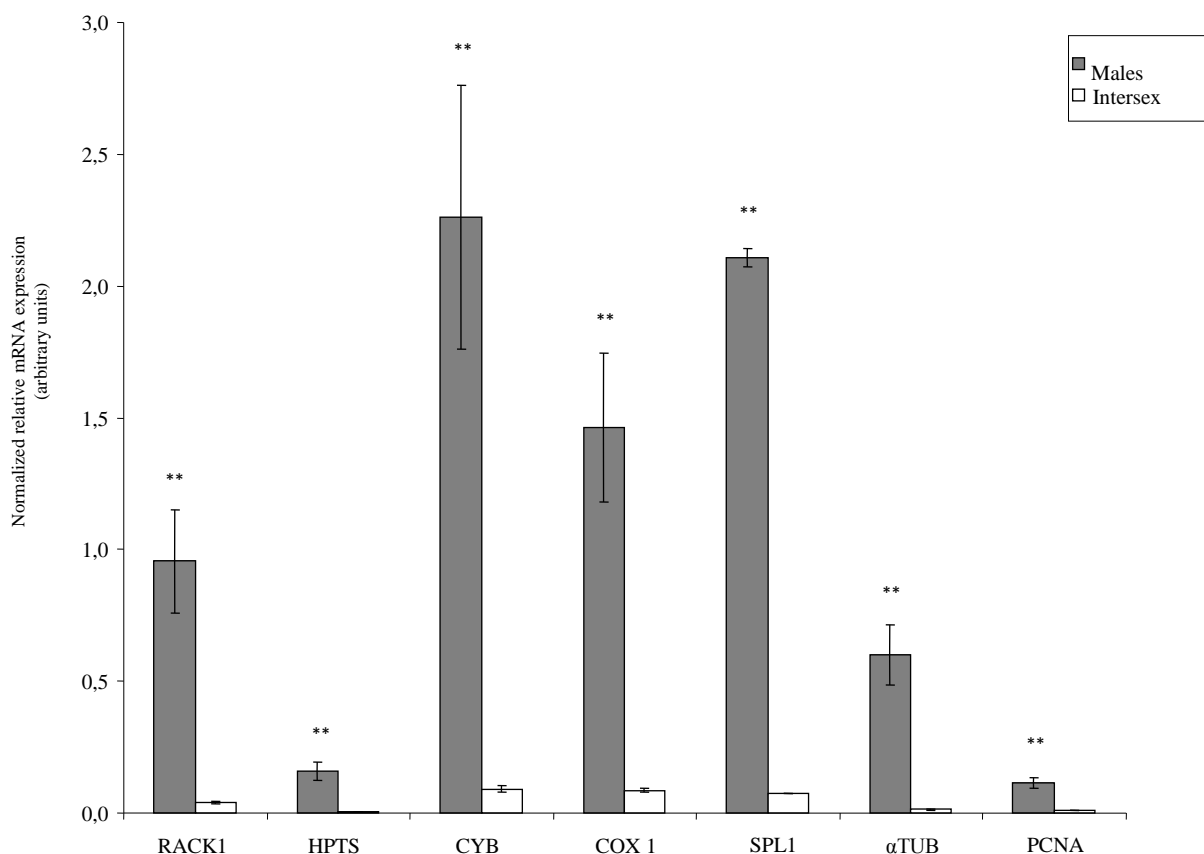


Figure 18 : Niveau d'expression de transcrits identifiés par SSH permettant de valider par qRT-PCR les résultats d'hybridation différentielle obtenus chez *S. plana*. Les histogrammes représentent les niveaux moyens normalisés  $\pm$  l'erreur standard. La présence de différences significatives est indiquée par les astérisques \*\*:  $p < 0.01$ , (n = 10).

RACK1 est une protéine qui interagit avec les kinases et joue un rôle central dans la signalisation. Une étude antérieure a rapporté que RACK1 interagit avec le récepteur des androgènes (AR), ce qui permet sa translocation du cytoplasme vers le noyau, et de contrôler ainsi la transcription de AR. RACK1, avec PCNA, sont les transcrits les plus affectés dans les palourdes intersexuées (Fig. 10). PCNA est impliqué dans le cycle cellulaire à l'étape de synthèse de l'ADN, en qualité d'un «serrage ADN» dans le processus de réplication. Les études utilisant l'huître *C. gigas* ont montré que dans les tubules gonadiques, l'expression de PCNA est élevée chez les hommes par rapport aux femmes, avec un niveau élevé et constant pendant les étapes initiales de la spermatogenèse. Ici, nous observons que la transcription de PCNA est altérée chez les intersexués. L'histone H3, régulée à la baisse chez les scrobiculaires intersexuées, est également impliquée dans le cycle cellulaire en contrôlant les différentes phases de la division cellulaire en mitose et méiose. Ensemble, la régulation négative de RACK1, PCNA et histone H3 suggère que des changements dans la signalisation cellulaire et dans le cycle cellulaire sont associés à la féminisation.



Deux protéines impliquées dans la physiologie de sperme (tektin et SPL) ont également été identifiées comme étant régulée à la baisse chez les mâles intersexués par rapport aux scrobiculaires mâles. Tektin est impliquée dans la mobilité des spermatozoïdes chez des souris et des études ont montré que les souris déficientes en tektin sont subfertiles. Chez les mollusques, une recherche de séquences (EST) dans les bases de données NCBI a révélé qu'un gène homologue chez l'huître (tektin3) est réprimé dans les huîtres expérimentalement exposés au mercure (GenBank accession no. CD648637, non publié). SPL1 a déjà été isolé à partir du couteau, *Ensis minor*, mais son rôle dans la physiologie de la reproduction n'a pas encore été élucidé.

L'étape suivante a consisté à valider les résultats de l'analyse de l'expression des gènes dans les palourdes provenant de populations naturelles et les gènes cibles clés qui peuvent être utilisés comme des outils d'analyse de surveillance de l'environnement. Suite à la découverte de l'intersexualité de *S. plana* dans la Manche occidentale, un programme intensif de travail sur le terrain a été entrepris sur les deux côtés de la Manche (La Manche). Les sédiments et les scrobiculaires ont été collectés pour l'analyse chimique afin d'étudier un éventuel lien entre l'apparition de l'intersexualité chez les scrobiculaires et la contamination. Les premiers résultats indiquent des niveaux élevés d'activité anti-androgénique sur de nombreux sites, ce qui suggère une possibilité de démasculinisation des individus.

### III.4. Identifications des mécanismes d'immunotoxicité chez le bar, *Dicentrarchus labrax*

#### III.4.1. Introduction

La prise de conscience de l'implication des facteurs environnementaux dans les maladies immunes de l'enfance et des adultes a conduit les chercheurs à porter une attention particulière aux phénomènes d'immunotoxicité survenant lors du développement (DIT : developmental immunotoxicity) (DeWitt et al, 2012; Luebke et al, 2006). Ainsi, l'augmentation de l'incidence de cas d'asthme et de maladies allergiques chez les enfants poussent à prendre en compte ces phénomènes DIT dans l'évaluation des risques (Bigsby et al, 1999; Bilitewski, 2008; Dietert et Zelikoff, 2008; Holsapple et O'Lone, 2012). En particulier, la plus grande sensibilité aux polluants environnementaux au cours de l'ontologie du système immunitaire suscite un intérêt pour la prise en compte des DIT, car un tel phénomène ne peut être évaluée par la surveillance des fonctions immunitaires chez les adultes (Burns-Naas et al., 2008). Même si l'ontologie du système immunitaire est très complexe, nécessitant une orchestration minutieuse et la régulation de nombreuses étapes, des processus clés du développement et des «fenêtres critiques» peuvent être identifiées (Burns-Naas et al, 2008).

En lien avec cet intérêt pour les perturbations du système immunitaire pendant le développement, des études ont été conduites chez les juvéniles de bars afin de (1) générer de nouvelles informations sur le développement du système immunitaire du bar, *D. labrax*, et (2) d'étudier les effets d'une exposition à des composés œstrogéniques pendant le développement. Cette étude a permis en outre d'étudier les liens entre système immunitaire et système endocrinien.

Deux organes du système immunitaire du bar ont reçu une attention particulière : le rein antérieur et le thymus. Le rein antérieur, également dénommé pronéphros, est l'homologue de la moelle osseuse des mammifères et est le lieu de l'hématopoïèse chez les téléostéens. C'est un organe permettant le développement et la prolifération des lymphocytes B. Il est également responsable du développement des capacités de phagocytose, de la reconnaissance des antigènes, de la formation d'immunoglobulines M et de la mémoire immunitaire par l'intermédiaire des centres mélano-macrophages qui sont les analogues primitives des ganglions lymphatiques (Rauta et al., 2012 ; Agius, 2003). Le thymus est un organe pair permettant la maturation et la prolifération des lymphocytes T. Il est divisé en une partie corticale et un compartiment médullaire comprenant des cellules épithéliales, des macrophages, des cellules dendritiques, les fibroblastes mésenchymateuses et les lymphocytes T à différents stades de maturation (Pallavicini et al., 2010). Alors que les premières spécifications de la lignée des lymphocytes T et l'ensemble des récepteurs aux antigènes se développent pendant la phase corticale, des différenciations ultérieures sont accomplies après migration des cellules vers la partie intérieure du thymus, c'est à dire la médulla (Boehm et al., 2012). Ainsi, le développement des lymphocytes T est étroitement associé à l'organogenèse du thymus, du fait de l'interaction avec des structures distinctes des différents compartiments thymiques pendant le processus de maturation (Vadstein et al., 2013).

#### III.4.2. Développement du système immunitaire

Les résultats ont permis de caractériser l'expression de récepteurs aux œstrogènes au sein du rein antérieur. Une augmentation continue de l'expression du récepteur  $\alpha$  a été mesurée pendant le développement et jusqu'à 250 jours post éclosion (jpe) tandis que l'expression du récepteur  $\beta 2$  augmente fortement après 75 jpe et atteint un maximum après 180 jpe (Fig. 19) suggérant que les œstrogènes sont impliqués dans le développement du rein antérieur et que les fonctions des différents récepteurs sont différentes selon les types. De même, l'expression de différentes cytokines a été mesurée. Les niveaux de l'interleukine  $\beta$ -1 suit la même évolution que celle du récepteur  $\beta 2$  avec un pic d'expression aux mêmes périodes. Les expressions de l'interleukine -6 et du facteur de croissance tumoral (TGF- $\beta$ ) augmentent de façon continue lors du développement du système immunitaire (Fig. 20). De façon intéressante, les pourcentages de populations leucocytaires se modifient de façon très notable après 180 jpe (Fig. 21). Une baisse importante de la population de lymphocytes B est enregistrée, probablement liée à leur migration vers d'autres compartiments tels que la partie postérieure du rein ou la rate où ils pourront achever leur maturation (Ye et al., 2011). Cette période de migration coïncide aussi avec une hausse très sensible de

l'activité macrophagique des populations leucocytaires du rein antérieur (Fig. 22). Ainsi la période de développement proche de 180 jpe apparaît comme une période particulière pouvant être très importante pour le système immunitaire.

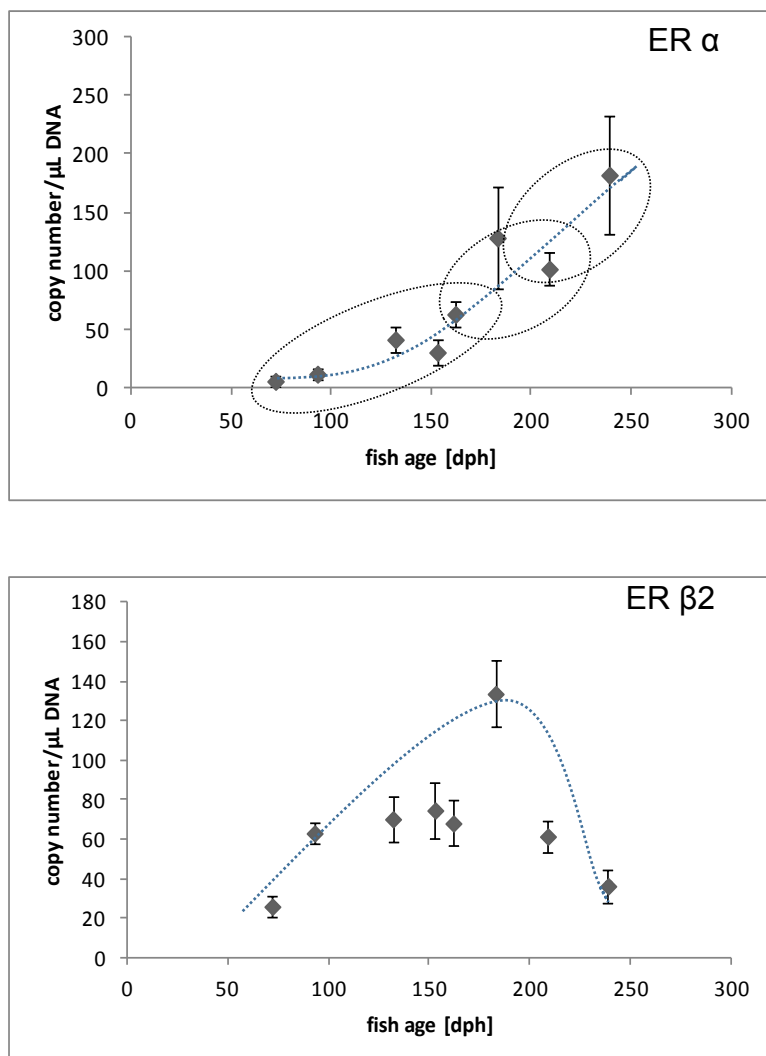


Figure 19 : Niveaux d'expression des gènes codant pour les récepteurs aux œstrogènes ER  $\alpha$  et ER  $\beta$ 2 dans le rein antérieur du bar au cours du développement (dph: days post hatch: jours après l'éclosion). Les points indiquent les moyennes  $\pm$  l'erreur standard. n = 8-11.

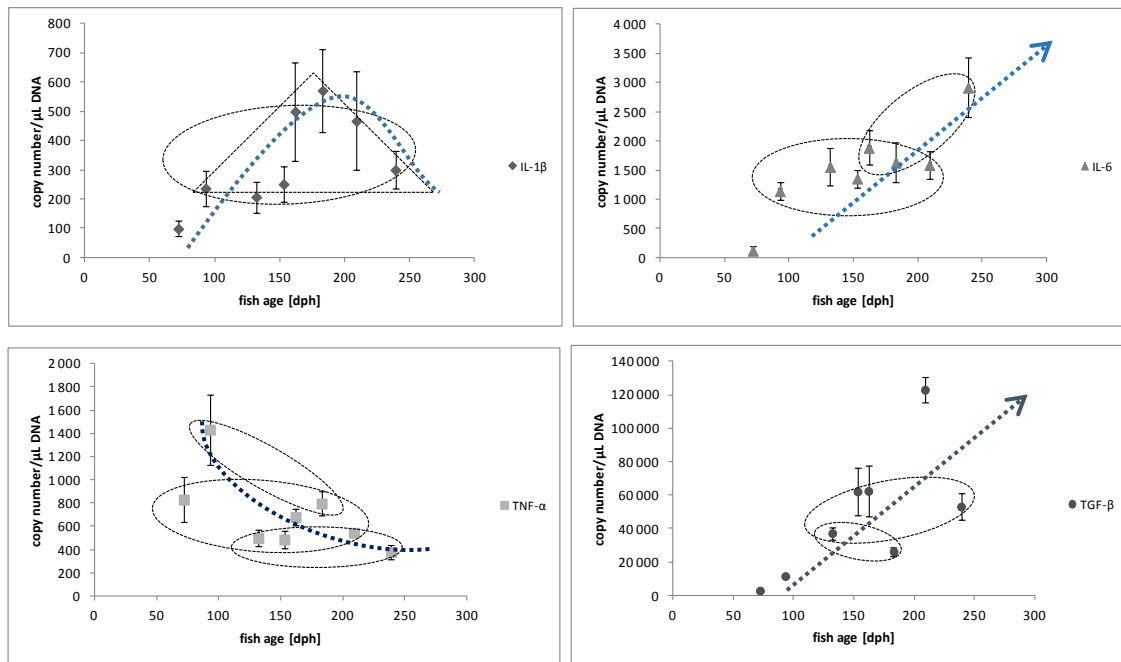


Figure 20 : Niveaux d'expression des gènes codant pour les cytokines IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6 et TGF- $\beta$  dans le rein antérieur du bar au cours du développement (dph: days post hatch: jours après l'éclosion). Les points indiquent les moyennes  $\pm$  l'erreur standard. n = 7-11.

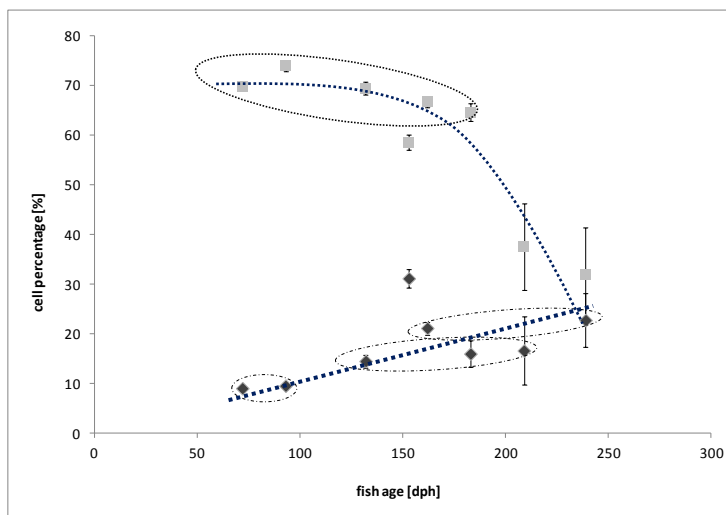


Figure 21: Evolution des populations de monocytes/macrophages (losanges) et de lymphocytes (carrés), dans le rein antérieur du bar au cours du développement; Les points indiquent les moyennes  $\pm$  l'erreur standard. n = 8-13. Les points regroupés dans un cercle ne sont pas significativement différents.

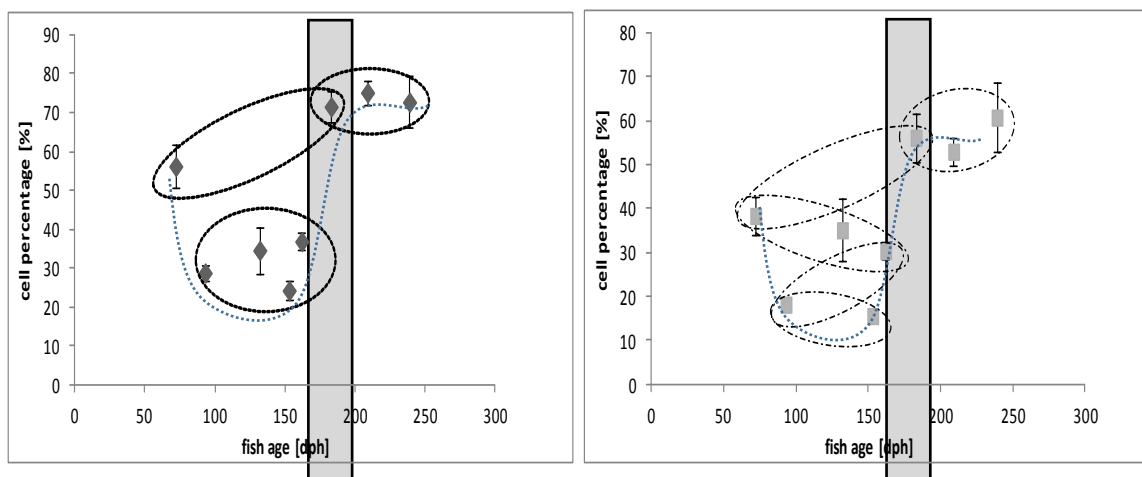


Figure 22: Activité de phagocytose des populations de monocytes/macrophages (losanges) et de lymphocytes (carrés), dans le rein antérieur du bar au cours du développement; Les points indiquent les moyennes  $\pm$  l'erreur standard.  $n = 8-13$ . Les points regroupés dans un cercle ne sont pas significativement différents.

### III.4.3. Réponses du système immunitaire à l'œstradiol

Des expériences répétées d'expositions de bars juvéniles à 20 ng/L d'œstradiol ont été conduites en conditions contrôlées au cours du développement du système immunitaire. Peu de modifications significatives ont été notées. Cependant des altérations manifestes de l'expression des récepteurs aux estrogènes ont été mesurées en fin de période d'exposition pour certains groupes de poissons (Fig. 23). Ces périodes se situent à 162 et 183 jpe, soit pendant la période critique identifiée précédemment. De même, l'exposition à l'œstradiol a entraîné une baisse significative de l'activité macrophagique aux mêmes périodes (Fig. 24).

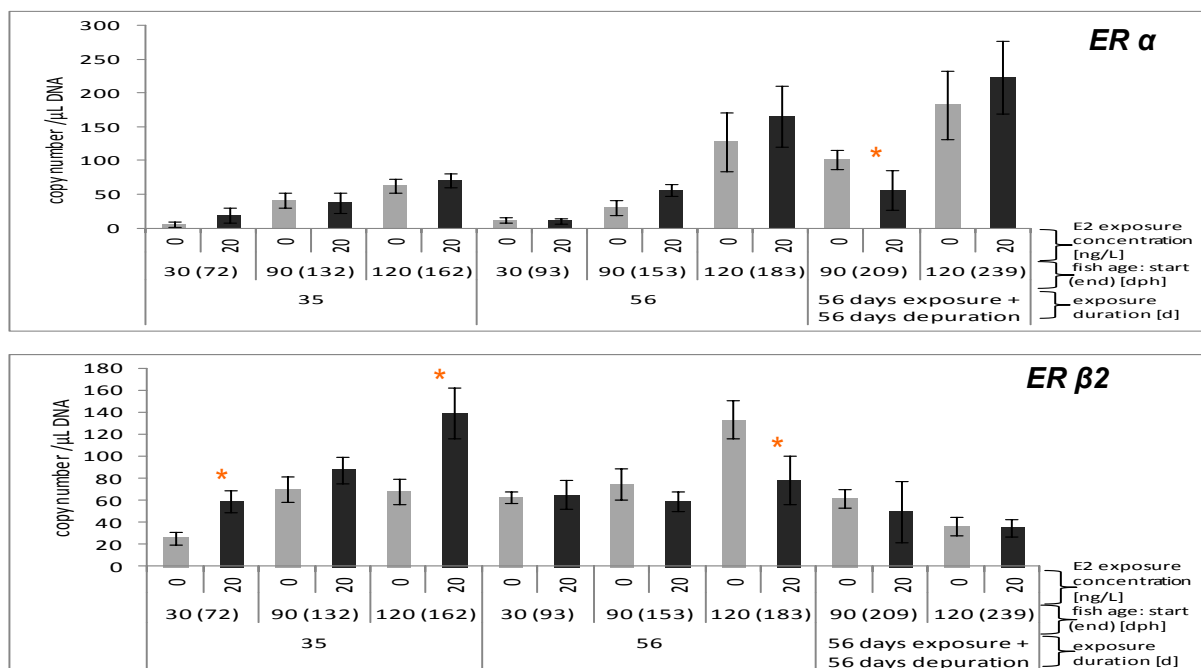


Figure 23: Niveaux d'expression des gènes codant pour les récepteurs aux œstrogènes ER  $\alpha$  et ER  $\beta 2$  dans le rein antérieur du bar après 35 (A) et 56 (B) jours d'exposition à 20 ng/L d'œstradiol (dph: days post hatch: jours après l'éclosion). Les points indiquent les moyennes  $\pm$  l'erreur standard.  $n = 8-11$ .

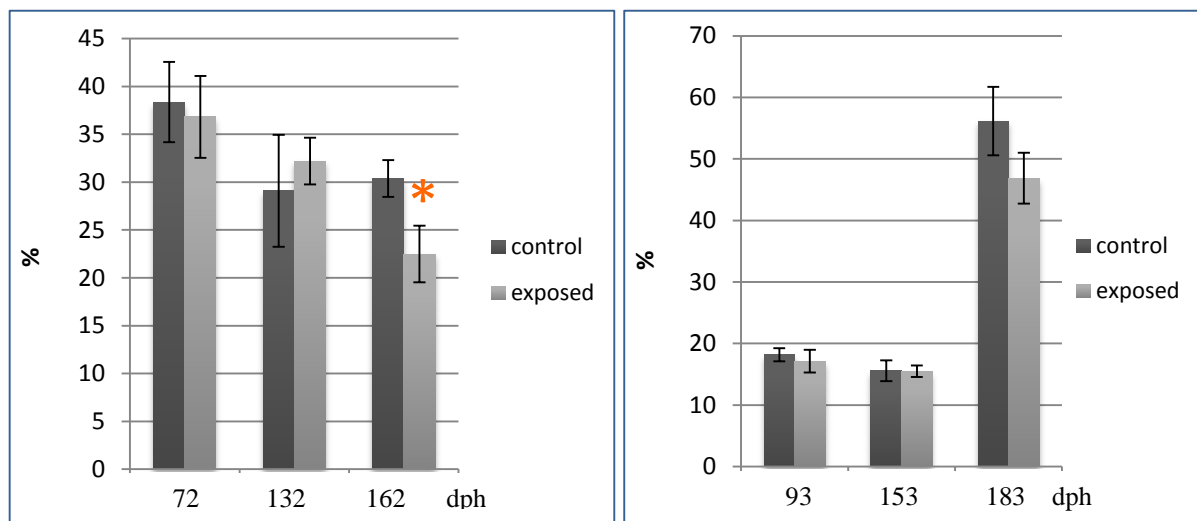


Figure 24: Activité de phagocytose des populations de leucocytes dans le rein antérieur du bar au cours du développement après 35 (A) et 56 (B) jours d'exposition à 20 ng/L d'œstradiol. L'activité a été mesurée à la fin de l'exposition, soit à 72, 132, 162 jours post-éclosion (dph) pour 35 jours d'exposition et 93, 153 et 183 jours post-éclosion pour 56 jours d'exposition. Les barres indiquent les moyennes  $\pm$  l'erreur standard.  $n = 8-13$ . Les points regroupés dans un cercle ne sont pas significativement différents.

Une étude histologique a été menée afin de documenter le développement du thymus chez le bar. Les résultats ont montré, en accord avec la littérature, que le thymus se régionalise en cortex et médulla après 60 jpe (Fig. 25) puis se développe de façon importante. Cependant l'exposition à 20 ng/L d'œstradiol a entraîné une hypertrophie manifeste de l'organe et de ses deux compartiments chez des bars exposés entre 90 et 153 jpe, c'est-à-dire pendant une période importante de maturation des lymphocytes T (Fig. 26).

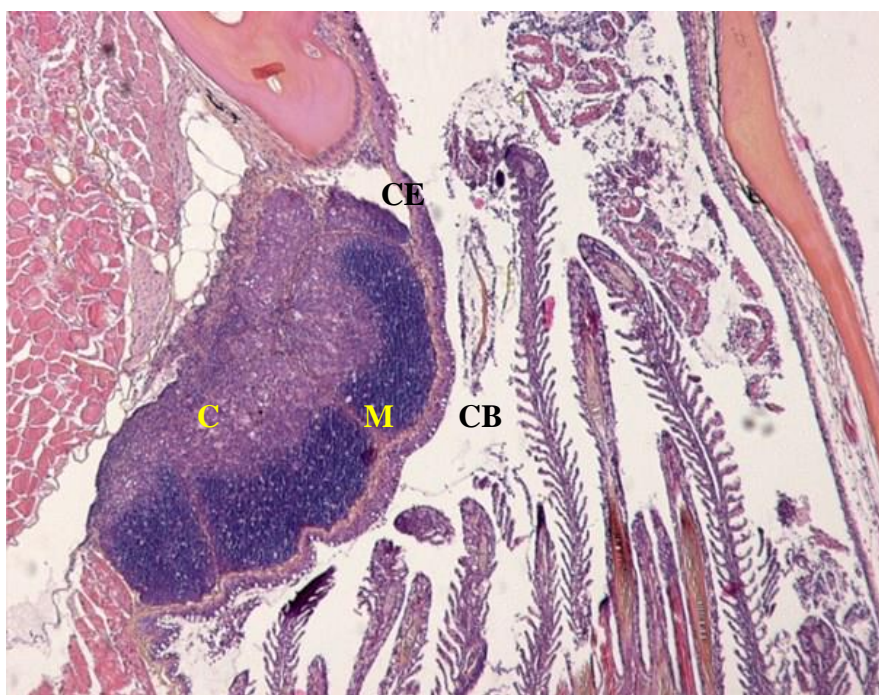


Figure 25: Observation histologique du thymus de bar, *D. labrax*, à 60 jours après éclosion montrant la partie corticale (C) et médullaire (M); CB = chambre branchiale; CE = couche épithéliale; coloration hématoxyline-éosine; x50.

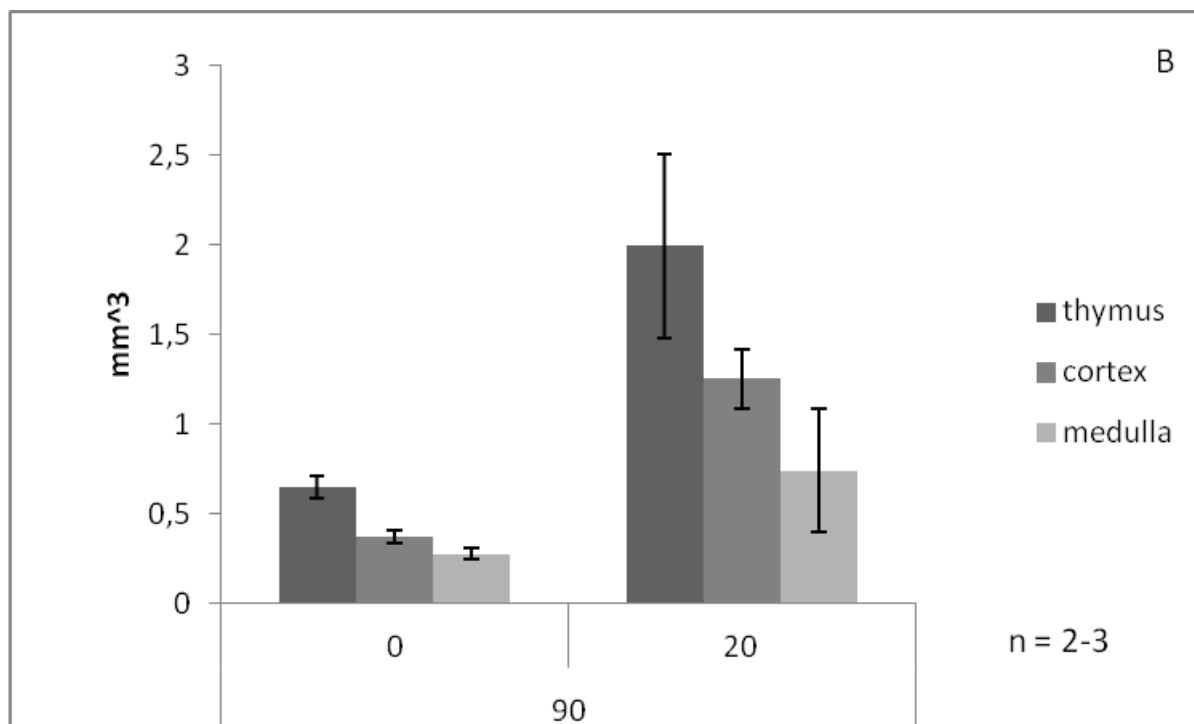


Figure 26: Volume du thymus, cortex et médulla, de bars de 90 jours post-éclosion exposés pendant 56 jours à 20 ng/L d'œstradiol. Les barres indiquent les moyennes  $\pm$  l'erreur standard.  $n = 3$ .

En conclusion, les travaux ont permis d'identifier une période particulière du développement et de sensibilité à une exposition œstrogénique du système immunitaire au sein du rein antérieur et du thymus. L'existence de ces périodes particulièrement sensibles doit être prise en compte pour mieux évaluer les risques liés à la présence de xénobiotiques lors du développement du système immunitaire.

### III.5. Identification d'un mécanisme androgéno-régulé chez le chabot (*Cottus sp.*)

Il a été rapporté chez le chabot un dimorphisme sexuel important au niveau du tissu rénal au cours de la période de reproduction (fig. 27). Ce dimorphisme est imputable à une modification du rein des poissons mâles associée à une hypertrophie des canaux néphrétiques et à la sécrétion de sialoglycoprotéines mise en évidence par l'utilisation d'histochimie (Bucher and Hofer, 1993, Hentschel, 1982). Il n'existe toutefois pas de données quant à l'inductibilité androgénique et la fonction de cette sécrétion rénale. Une expérimentation préliminaire menée à l'INERIS a mis en évidence une augmentation de l'indice néphro-somatique, des modifications histologiques du rein et des sécrétions de mucopolysaccharides acides et neutres chez des chabots exposés pendant 7 jours à 20  $\mu\text{g/L}$  de 11-cétotestostérone. Ces premiers résultats demandent confirmation mais laissent à penser que l'hypertrophie des canaux néphrétiques et la synthèse de sialoglycoprotéines pourrait être inducible par les androgènes. Ainsi, cette espèce est susceptible de disposer de biomarqueurs d'androgénicité. Afin d'identifier un marqueur d'exposition aux androgènes chez le chabot le travail a consisté, dans un premier temps, à identifier des signaux biochimiques et/ou histologiques androgéno-régulés. Les différents signaux mis en évidence sont alors été caractérisés par des expérimentations en laboratoire et sur le terrain grâce à l'échantillonnage de sites faiblement anthropisés et de sites connus pour être contaminés par des molécules à activité androgénique (Sanchez, et al., 2008).



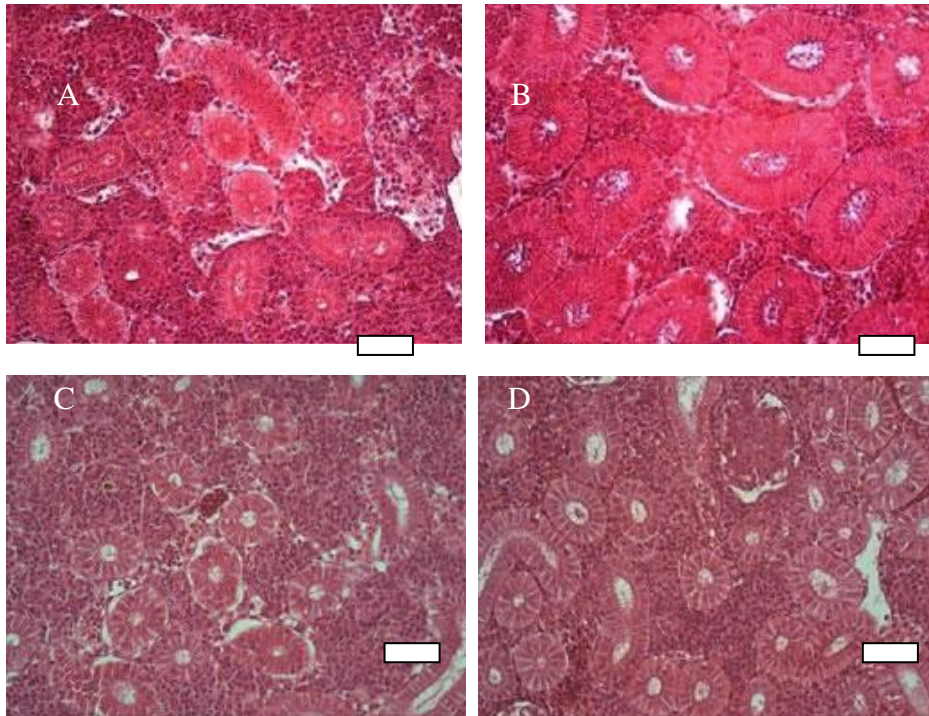


Figure 27: Coupes transversales de rein antérieur de chabot femelle (A) et mâle (B) en période de reproduction, et de femelle (C) et mâle (D) hors période de reproduction. Les barres représentent 30  $\mu\text{m}$ .

Dans le but de vérifier si l'hypertrophie des canaux néphrétiques et la synthèse de sialoglycoprotéines pouvait être inductible par les androgènes chez le chabot, des chabots provenant du terrain et mis à dépurier au laboratoire pendant environ deux mois ont été exposés à différentes concentrations de différentes molécules androgéniques de référence (DHT, Trenbolone) dissoutes dans du diméthylsulfoxyde (0.001 % de DMSO par aquarium) ou seulement à du solvant pour les témoins. Au cours des expositions, ils ont été placés dans des aquariums contenant 4L d'eau à raison de 10 chabots (sexes confondus) par aquarium. Au terme de l'exposition, les poissons ont été sacrifiés, mesurés, pesés et sexés. Les reins ont été prélevés et pesés afin de pouvoir développer un marqueur histologique à l'image du KEH (Kidney Epithelium Height) disponible chez l'épinoche (Borg, 1993). Les gonades ont également été prélevées afin de vérifier histologiquement le sexe des poissons.

Dans toutes les expérimentations chez les chabots, les valeurs de KEH obtenues chez les mâles et les femelles ne différaient pas. Les résultats présentés sont donc un pool des valeurs obtenues chez les deux sexes.

Aucune différence de KEH n'a pu être observée entre les chabots exposés à la DHT et les témoins. En effet, la moyenne est de  $16 \pm 1.05 \mu\text{m}$  pour les témoins et de  $16,53 \pm 0.92 \mu\text{m}$  pour les chabots qui ont subi un traitement à  $5 \mu\text{g/L}$  de DHT (Fig. 28).



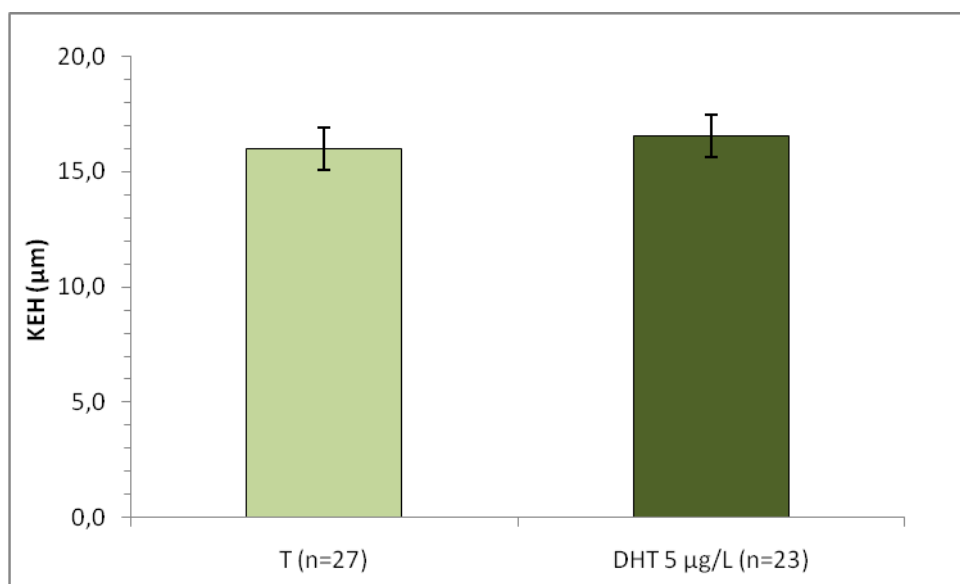


Figure 28: Graphique représentant les valeurs de KEH (Kidney Hepithelium Height) obtenues sur les reins de chabots exposés à la dyhydrotestostérone (DHT) pendant 21 jours ou au solvant DMSO (T). Les données sont présentées sous forme de moyenne  $\pm$  SD.

Il apparaît alors intéressant de s'interroger sur le mécanisme d'action de la DHT chez le chabot. En effet, différentes publications ont mis en évidence le pouvoir androgénique de cette hormone. Il s'agit en effet d'un métabolite biologiquement actif de la testostérone, formé sous l'action de l'enzyme 5- $\alpha$ -réductase. Il a ainsi été montré qu'une exposition à la DHT à des concentrations mesurées supérieures ou égales à 6  $\mu\text{g/L}$  pendant 14 jours augmentait significativement le nombre de tubercules nuptiaux chez les deux sexes de vairon à tête de boule. (Panter, et al., 2004). De même, chez l'épinoche il a été observé une réponse dose dépendante de production de spiggin en exposant des femelles à des concentrations croissantes de DHT supérieures ou égales à 3  $\mu\text{g/L}$  (Katsiadaki, et al., 2002a). Cependant, certaines substances androgéniques sont plus efficaces que d'autres pour stimuler l'hypertrophie rénale chez l'épinoche. Ainsi, la 11-cétotestostérone apparaît comme étant plus puissante que la 17 $\alpha$ -méthyltestostérone (De Ruiter and Mein, 1982) et la dihydrotestostérone (Borg, 1993). La 17 $\alpha$ -méthyltestostérone est elle-même plus puissante que la dihydrotestostérone (Katsiadaki, et al., 2002a) et la 11-cétoandrostenedione plus puissante que l'androstenedione (Andersson, et al., 1988). Katsiasaki en partant du principe que la différence de puissance des androgènes n'est pas toujours liée au degré d'affinité pour le récepteur concerné suppose alors qu'elle peut aussi être due à un différent degré de liaison aux protéines qui lient le stéroïde avant tout contact avec le récepteur.

Une exposition similaire a donc été réalisée en utilisant la trenbolone. En effet, cet androgène synthétique est très utilisé aux Etats-Unis en tant que promoteur de croissance chez les bovins. Cette substance est stable dans les déchets animaux et se retrouve dans les milieux aquatiques via des rejets directs, des eaux de ruissellement ou les deux. En outre, il a été montré que la 17 $\beta$ -trenbolone était clairement androgénique *in vivo* chez le vairon à tête de boule à des concentrations mesurées supérieures ou égales à 0.027  $\mu\text{g/L}$  lors d'une exposition de 21 jours. En effet, il est apparu des tubercules nuptiaux au niveau de la tête sur les femelles (Ankley, et al., 2003).

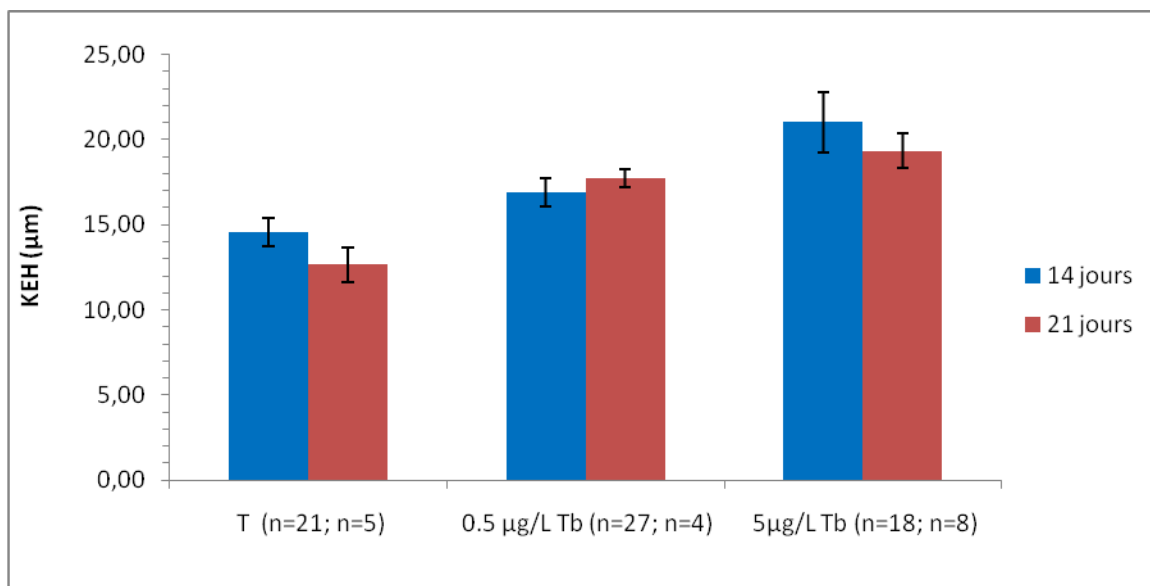


Figure 29 : Graphique représentant les valeurs de KEH (Kidney Hepithelium Height) obtenues sur les reins de chabots exposés à la trenbolone (Tb) ou au solvant DMSO (T) pendant 14 jours ou pendant 21 jours. Les données sont présentées sous forme de moyenne  $\pm$  SD.

Les chabots exposés à la trenbolone montrent une hypertrophie rénale dose dépendante lors des deux durées d'exposition (Fig. 28). De plus, pour un même traitement il n'y a pas de différence entre les deux durées d'exposition. Ainsi, la synthèse de la ou les sialoglycoprotéines apparaît comme étant effectivement sous contrôle androgénique.

Afin d'identifier et caractériser la ou les sialoglycoprotéines rénales induites par les androgènes, une approche protéomique basée sur l'électrophorèse en deux dimensions et la spectrométrie de masse est également en cours de réalisation en collaboration avec l'UBO de Brest afin à terme de pouvoir développer et de valider un ELISA quantitatif spécifique. Des échantillons rénaux de chabots traités à la trenbolone et de chabots témoins ont ainsi été comparés afin de cibler les variations d'expression protéiques (Fig. 29).

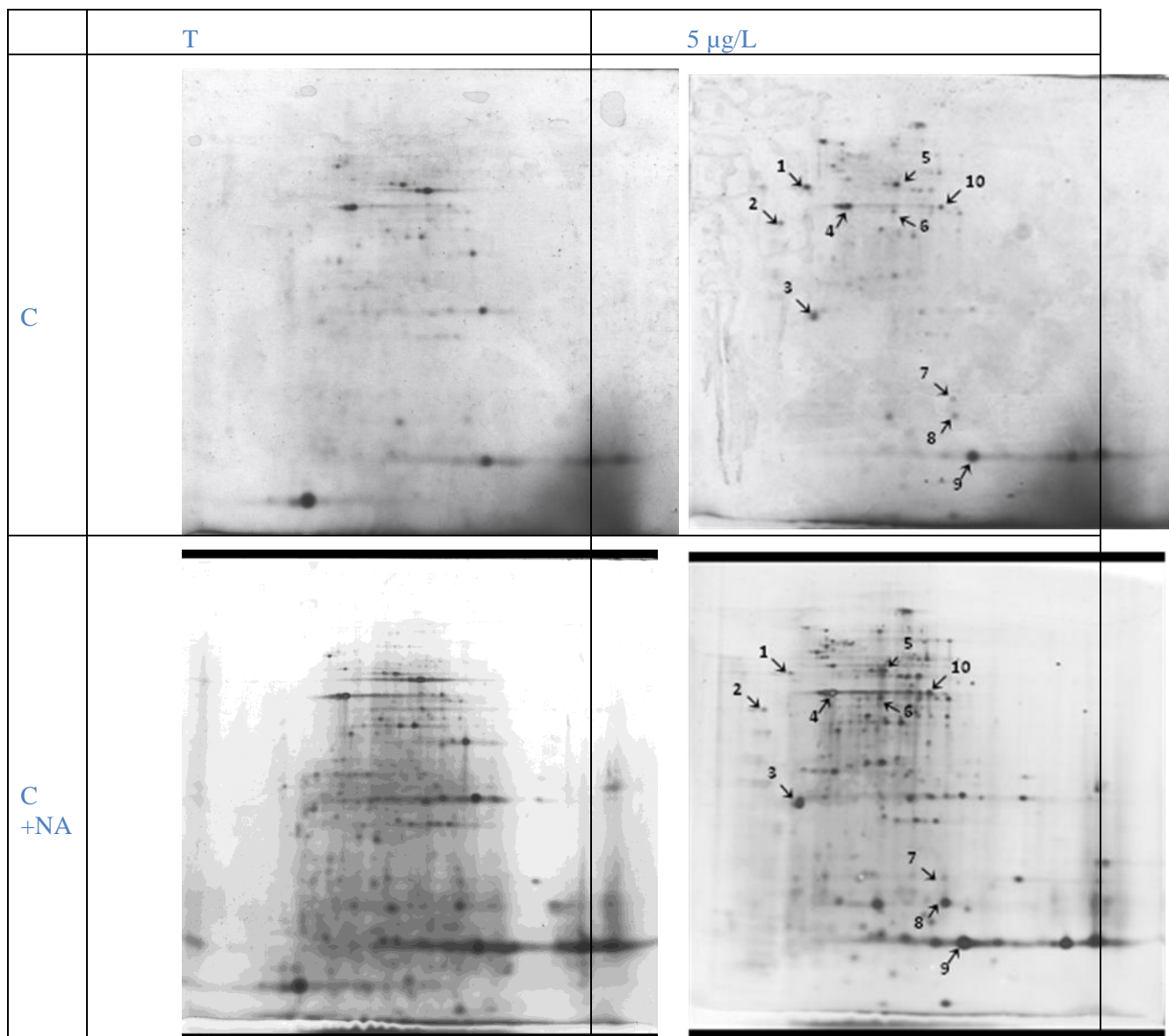


Figure 30 : photographies de gels-2D. Les points noirs représentent les protéines contenues dans le rein d'un chabot femelle Témoin (T) et d'un chabot femelle traité à la trenbolone à 5  $\mu\text{g/L}$  en utilisant soit une coloration au bleu de coomassie (BC) soit une coloration au bleu de coomassie suivie d'une coloration au nitrate d'argent (BC + NA).

Après une coloration des gels à l'argent on voit plus de spots qui migrent qu'en utilisant une simple coloration au bleu de coomassie (figure 30). On observe des différences entre les protéomes chez les chabots exposés à la Trenbolone à 5  $\mu\text{g/L}$  et les témoins (Spots numérotés). Jusqu'à présent, 3 protéines sur les 9 différenciellement exprimées ont été identifiées en utilisant la spectrophotométrie de masse. Le spot numéro 1 était largement amplifié chez les chabots contaminés (augmentation bien visible au bleu de coomassie). Il s'agit de la sous unité beta de l'ATP synthase. Le spot numéro 9 apparait comme étant la beta globine et le 8 est la nucléoside di-phosphate kinase.

### III.6. Identification de perturbations endocriniennes chez les gardons femelles (*Rutilus rutilus*)

Il est établi qu'un grand nombre de substances chimiques artificielles ou naturelles présentes dans l'environnement sont capables de perturber le système endocrinien des organismes exposés, en interférant avec leur fonction endocrine normale. Ces composés, appelés perturbateurs endocriniens (PE), sont responsables d'altérations dans le développement, la reproduction, l'homéostasie, la physiologie et donc la santé des vertébrés (Colborn et al, 1993). Les perturbateurs endocriniens peuvent moduler la fonction, les niveaux et la distribution des hormones endogènes des organismes exposés en imitant ou contrariant l'action des hormones, ou en modulant la synthèse de l'hormone et son métabolisme (Segner, 2009).

Des perturbations du système endocrinien ont été rapportées dans presque toutes les classes de vertébrés, y compris des mammifères, les oiseaux, les reptiles et les poissons (Tyler et al, 1998). Comme le système aquatique est le réceptacle ultime de la plupart des produits chimiques libérés dans l'environnement, les espèces aquatiques dont les poissons sont des modèles couramment utilisés pour la biosurveillance des écosystèmes (Jobling et Tyler, 2003). Parmi les effets des perturbateurs endocriniens, des altérations du système reproducteur ont été signalés dans différentes espèces de poissons d'eau douce dans le monde entier avec des impacts tels que des taux plasmatiques anormaux de stéroïdes et vitellogénine (VTG), un succès de reproduction réduit, une fonction neuroendocrine altérée, l'apparition d'ovocytes dans les testicules des poissons mâles, et une croissance altérée des testicules et des ovaires (Kime, 1998; Vos et al, 2000; Van Der Kraak et al, 1992; Jobling et Tyler, 2003; Sumpter, 2002). Le gardon (*Rutilus rutilus*) un cyprinidé omniprésent dans les écosystèmes d'eau douce européens a été choisi comme une espèce sentinelle pour la biosurveillance perturbation endocrinienne dans plusieurs études (Tyler et al, 2007). Différentes altérations du système reproducteur ont été montrés pour le gardon vivant dans les rivières britanniques (Jobling et Tyler, 2003), les eaux danoises (Bjerregaard et al, 2006), un lac Suédois (Noaksson et al, 2001) et dans les rivières françaises (Minier et al, 2000; Maltret-Géraudie et al, 2008).

La Seine constitue une des rivières les plus polluées d'Europe avec un bassin caractérisé par une forte densité de population (250 p.km<sup>-2</sup> en moyenne) et fortement impacté par 40% des activités agricoles et industrielles françaises (Lafite et Romana, 2001). En conséquence, l'eau et les sédiments de la Seine montre des niveaux élevés de contaminants comme les nitrates, les phosphates, les métaux lourds, les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP), les polychlorobiphényles (PCB) et les pesticides tels que les triazines (Minier et al, 2006; Billen et al, 2001; Thévenot et al, 1998; Horowitz et al, 1999; Grosbois et al, 2006). Des preuves de la présence de composés œstrogéniques tels que l'éthinylestradiol, l'estrone et le nonylphénol ont été trouvés dans les poissons et les sédiments de Seine (Peck et al, 2007; Minier et Amara, 2008). Les gardons échantillonnés dans la Seine sont contaminés par des composés organochlorés comme les BPC et les pesticides synthétiques (Blanchard et al, 1997; Guérit et al, 2008). Des études antérieures ont également signalé que le gardon mâle de la Seine présente une incidence élevée d'intersexualité, des niveaux modifiés de stéroïdes et de vitellogénine ainsi qu'une gamétogenèse altérée (Maltret-Géraudie et al, 2008; Géraudie et al, 2011). La plupart des études sur les perturbations endocriniennes ont mis l'accent sur les réponses œstrogéniques chez les mâles, cependant, l'altération du système reproducteur femelle pourrait être encore plus préjudiciable pour la population. En conséquence, cette étude s'est concentrée sur les altérations du système reproducteur des gardons femelles vivant en Seine.

Des gardons femelles matures (> 16 cm de long) ont été pêchées à l'automne 2010 à partir de trois endroits différents de la Seine (Normandie, France) à l'aide de filets ou de lignes. Le site de référence, Venables (Ven), est une ancienne carrière de sable avec de faibles niveaux de contamination où aucun signe de perturbation endocrinienne chez le gardon n'a été trouvé (absence de poissons intersexués, concentration plasmatique en VTG des gardons mâles inférieure à 20 ng ml<sup>-1</sup>; Géraudie et al., 2010a). Les deux autres sites d'échantillonnage, Poses et Elbeuf, correspondent à des zones anthropisées avec des rejets équivalents à 442 et 11 en population ajusté respectivement. Les analyses chimiques de ces deux sites ont été réalisées par le réseau de surveillance de l'agence de l'eau Seine Normandie qui a montré la présence d'un mélange de différents hydrocarbures polycycliques aromatiques, de polychlorobiphényles, d'éthers diphenyliques polybromés et les phtalates.

La longueur et le poids moyen des poissons dans les 3 sites échantillonnés n'étaient pas significativement différents les uns des autres comme indiqué dans le tableau 6. L'indice de condition corporelle de Fulton (K) était similaire pour les poissons de tous les sites. Toutefois, l'indice gonadosomatique (GSI) était 1,6 et 1,7 fois moindre chez les poissons des sites contaminés (Poses et Elbeuf;  $4,75 \pm 0,58$  et  $4,48 \pm 0,38$ ) par rapport aux poissons du site de référence (Venables,  $7,68 \pm 0,63$ ).

Table 6: Paramètres biologiques des gardons femelles collectées dans le site de référence (Ven) et les sites impactés (Elbe et Pos) de la Seine. Les lettres distinctes indiquent l'existence de différences significatives entre les groupes ( $p < 0,05$ ).

	Venables	Poses	Elbeuf
length (cm)	$20.49 \pm 0.5$	$18.63 \pm 0.79$	$20.56 \pm 0.84$
weight (g)	$104.09 \pm 13.7$	$81 \pm 16.94$	$110.58 \pm 15.99$
gsi	$7.68 \pm 0.63^a$	$4.75 \pm 0.58^b$	$4.48 \pm 0.38^b$
fulton's k factor	$1.14 \pm 0.02$	$1.08 \pm 0.04$	$1.17 \pm 0.04$

Les stades de maturation des ovaires de poissons déterminés par des observations histologiques sont présentés à la figure 31. La plupart des poissons des sites présentaient des ovocytes en vitellogénèse, et en majorité des ovocytes secondaires. Le pourcentage de poissons présentant des ovocytes primaires était plus élevée dans les poissons des sites touchés (27 et 14%) par rapport aux poissons à partir du site de référence (5%) montrant un retard de maturation dans ces sites.

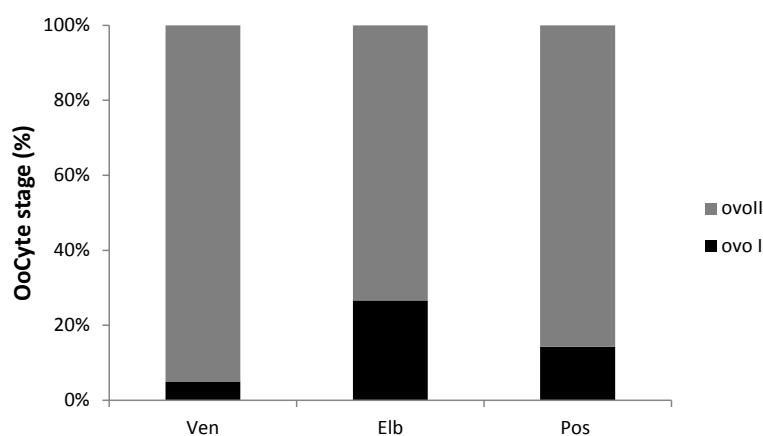


Figure 31: Proportions d'ovocytes primaires (Ovo I) et secondaires (Ovo II) indiquant les stades de maturation des ovaires de gardons femelles échantillonnés au site de référence (Ven) et dans les sites plus contaminés (Elbe et Pos) de la Seine.

Le diamètre des ovocytes secondaires dans les poissons des différents sites d'échantillonnage a également été enregistrée (figure 32). Les poissons des deux sites touchés, Elbeuf et Poses présentent des diamètres d'ovocytes secondaires nettement réduits par rapport à ceux des issus du site de référence soit 589, 599 et 824  $\mu\text{m}$  en moyenne respectivement.

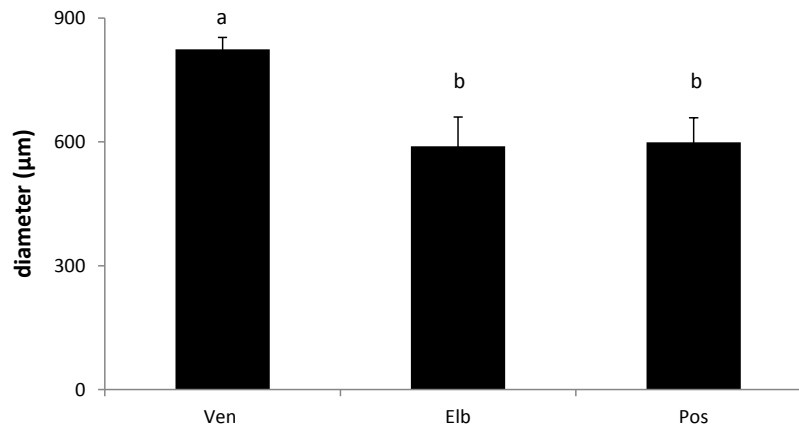


Figure 32: Diamètre des ovocytes de gardons femelles provenant du site de référence (Venables) et des sites plus contaminés (Elbeuf et Poses) de la Seine. Les lettres distinctes indiquent des différences significatives entre les groupes ( $p < 0,05$ ).

Les niveaux de VTG plasmatiques se sont avérés significativement plus faibles pour les poissons des sites contaminés par rapport aux poissons de Venables, le site de référence (figure 33). Les concentrations plasmatiques étaient 4 et 2 fois plus faible chez les poissons d'Elbeuf et de Poses respectivement comparés aux poissons échantillonnés dans le site de référence.

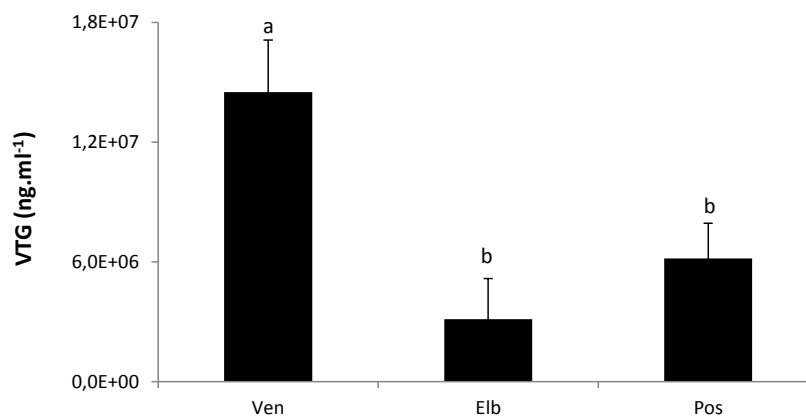


Figure 33: Concentration plasmatique en vitellogénine (VTG) de gardons femelles provenant du site de référence (Venables) et les sites plus contaminés (Elbeuf et Poses) de la Seine. Les lettres distinctes indiquent des différences significatives entre les groupes ( $p < 0,05$ ).

Pour l'activité l'aromatase ovarienne, seuls les poissons avec des ovocytes secondaires ont été analysés. L'activité de l'aromatase était significativement réduite (d'un facteur 3) à Elbeuf et Poses par rapport à celle mesurée pour les poissons de Venables (Fig. 34).

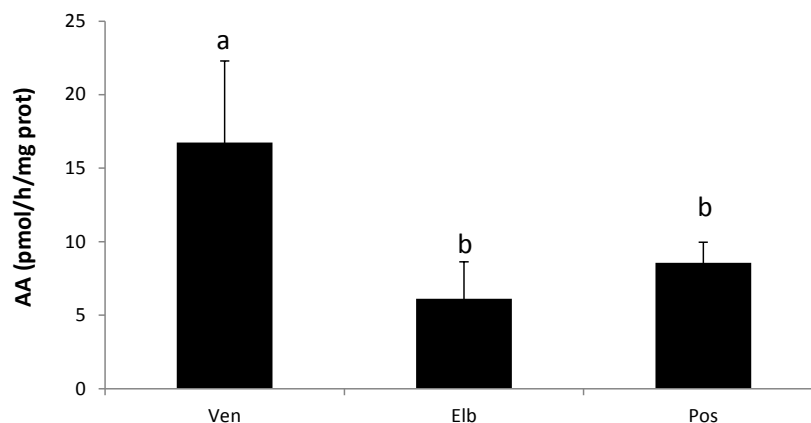


Figure 34: Activité aromatasé gonadique de gardon femelle provenant du site de référence (Venables) et des sites impactés (Elbeuf et Poses). Les lettres distinctes indiquent des différences significatives entre les groupes ( $p < 0,05$ ).

En conclusion, cette étude montre plusieurs altérations du système de reproduction des gardons femelles vivant en Seine. Les 3 sites de prélèvement sont situés dans un rayon de 26 km et sont soumis aux mêmes conditions météorologiques excluant l'incidence possible des facteurs abiotiques sur la maturation des gonades. La taille et le poids de tous les poissons des différents sites étaient semblables indiquant qu'un échantillon homogène de femelles venant à échéance a été choisi. Cette étude fournit des informations supplémentaires sur l'état de reproduction et du système endocrinien des gardons de la Seine et indique que certains effets constatés pourraient conduire à une faible fécondité des poissons et ainsi avoir des conséquences sur la progéniture et plus généralement sur la population de gardons en Seine.

### III.7. Etude intégrée des perturbations chez le flet (*Platichthys flesus*)

#### III.7.1. Introduction

Depuis une décennie, on observe une intégration de plus en plus poussée de multiples biomarqueurs sur les modèles poissons et bivalves, permettant une meilleure évaluation de la qualité des eaux marines et estuariennes en Europe (Hagger et al. 2008 ; Thain et al. 2008 ; Lyons et al. 2010). Dans le présent projet, nous avons concentré nos travaux sur un poisson estuarien, le flet (*Platichthys flesus*) considéré comme une espèce sentinelle pertinente pour le monitoring de la qualité des eaux dans les écosystèmes côtiers Européens (Vethaak and Wester 1996 ; Stentiford et al. 2003 ; Lyons et al. 2004 ; SGIMC 2011 ; Vethaak et al. 2011 ; Laroche et al. 2013). Nous avons considéré dans ce travail une grande diversité de marqueurs, prenant en compte les différents niveaux d'organisation du vivant, pour mieux approfondir nos connaissances sur les réponses du poisson au stress chimique :

- les dommages à l'ADN (génotoxicité)
- les réponses moléculaires & biochimiques (i.e. les niveaux d'expression de différents gènes candidats, ou leur traduction sous la forme de quantités de protéines ou d'activités enzymatiques associées)
- les réponses immunotoxicologiques
- les profils isotopiques en tant qu'indicateurs intégrateurs de la position trophique mais aussi du métabolisme énergétique et des paramètres environnementaux

- les traits de vie, particulièrement la croissance moyenne journalière, ainsi que la stratégie d'utilisation de l'habitat étudiée par une approche microchimique au niveau de l'otolithe
- enfin, la variabilité génétique dans les populations naturelles de flet, en considérant particulièrement un gène candidat susceptible de subir des pressions de sélection dans les milieux pollués.

Cette étude a mis en œuvre une expérience de contamination expérimentale de flets au laboratoire afin de mettre en évidence les effets de cocktails complexes de PCBs (Polychlorobiphényles) et HAPs (Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques) sur le poisson, parallèlement à des mesures de biomarqueurs réalisées sur des populations naturelles de flet exposées à des contaminations contrastées en milieux estuariens.

Le flet, *P. flesus* (Fig. 35), de la famille des pleuronectidés est un poisson plat euryhalin vivant préférentiellement sur les fonds sablo-vaseux et vaseux des zones estuariennes et côtières (Dénél, 1981) ; cette espèce est largement répartie en Europe, de la Norvège au Portugal. Le flet est un poisson catadrome, vivant la majeure partie de l'année dans les zones estuariennes et les fleuves, il va rejoindre l'océan à l'âge adulte pour se reproduire. Le long des côtes françaises, la reproduction a lieu au cours de l'hiver (janvier à mars). Les œufs pondus sont pélagiques; après 7 jours, les larves éclosent et présentent une symétrie bilatérale. Les larves vont se métamorphoser en juvéniles en se rapprochant des côtes ; ces derniers seront recrutés en estuaire au mois de mai, à une taille comprise entre 15 et 30 mm. Les flets vont rester de 2 à 3 ans dans les estuaires jusqu'à atteindre une taille entre 110 et 250mm lors du second automne, présentant ainsi une grande variabilité inter-individuelle dans leur taux de croissance (Masson, 1987). Au cours de l'hiver, les flets devenus sexuellement matures iront rejoindre les adultes pour se reproduire à l'embouchure des fleuves ou en mer, et donner ainsi naissance à la génération suivante.



Figure 35 : le flet, *Platichthys flesus*

#### III.4.2. Biomarqueurs étudiés

Différents biomarqueurs ont été considérés dans cette étude :

- les dommages à l'ADN mesurés par le test Comète (sang)

En collaboration avec Alain Devaux et Sylvie Bony (INRA, Vaulx en Velin - UMR LEHNA, Université Claude Bernard Lyon I), le test des comètes a été réalisé sur les hématies de flets avec d'évaluer la génotoxicité des polluants. Le test des comètes permet d'évaluer les cassures simple et double brins de l'ADN (Lee et Steinert, 2003).

- l'expression d'un certain nombre de gènes candidats (foie)

Face à une contamination chimique, un organisme peut modifier l'expression de ses gènes pour s'acclimater (au sens physiologique du terme) à cette nouvelle situation. Cette modification est souvent considérée comme une réponse précoce de l'organisme soumis à un stress chimique. Parmi les différents gènes dont l'expression est modifiée lors d'une contamination, le cytochrome P450 1A (CYP1A) est particulièrement étudié. Il intervient dans la transformation des xénobiotiques hydrophobes en métabolites hydrosolubles, participant ainsi au processus de biotransformation de certains polluants organiques toxiques tel que les HAPs (Sarasquete et Segner, 2000). De manière simplifiée, la présence de contaminants dans l'organisme déclenche des processus de détoxification et



donc une augmentation de l'expression du gène CYP1A. Ce processus a été démontré chez de nombreuses espèces de poissons dont le flet (Evrard *et al.*, 2010a) et le poulamon (Wirgin and Waldman 1998). Des études ont montré une régulation du gène de la BHMT en présence de contaminants chez les téléostéens (*e.g.* Lu *et al.*, 2012; Yum *et al.*, 2005). La BHMT pourrait intervenir dans les processus de détoxification de phase II (Marchand *et al.*, 2006). Des populations naturelles de flet vivant dans des environnements contrastés ont montré des différentiels d'expression du gène BHMT (Evrard *et al.*, 2012; Marchand *et al.*, 2006).

#### - le système immunitaire des poissons

Un des objectifs majeurs de ce travail a été d'explorer la pertinence des investigations en immunotoxicologie. Le système immunitaire est un ensemble de facteurs humoraux et cellulaires qui a pour fonction de maintenir l'homéostasie, de protéger l'organisme des parasites, infections et proliférations malignes. Il ne répond donc pas directement à la présence de polluants. Néanmoins, la présence de xénobiotiques peut affaiblir le système immunitaire d'un organisme, diminuant ainsi ses capacités de défense par exemple vis-à-vis des parasites (Dunier 1996; Dunier and Siwicki 1993). Le système immunitaire des poissons est assez proche de celui des vertébrés supérieurs (Zelikoff, 1998). Les poissons possèdent des mécanismes de défenses spécifiques et non spécifiques, tous deux incluant des réponses humorales et cellulaires.

Le système du complément, souvent appelé simplement complément, a un rôle important dans le système immunitaire inné et fait intervenir environ 35 protéines membranaires ou solubles (Holland et Lambris, 2002). Les fonctions du complément sont multiples : il participe à la lyse des pathogènes, à la réaction inflammatoire, il peut stimuler la phagocytose ou encore participer à la modulation de la production d'anticorps (DeFranco, Robertson et Locksley, 2009).

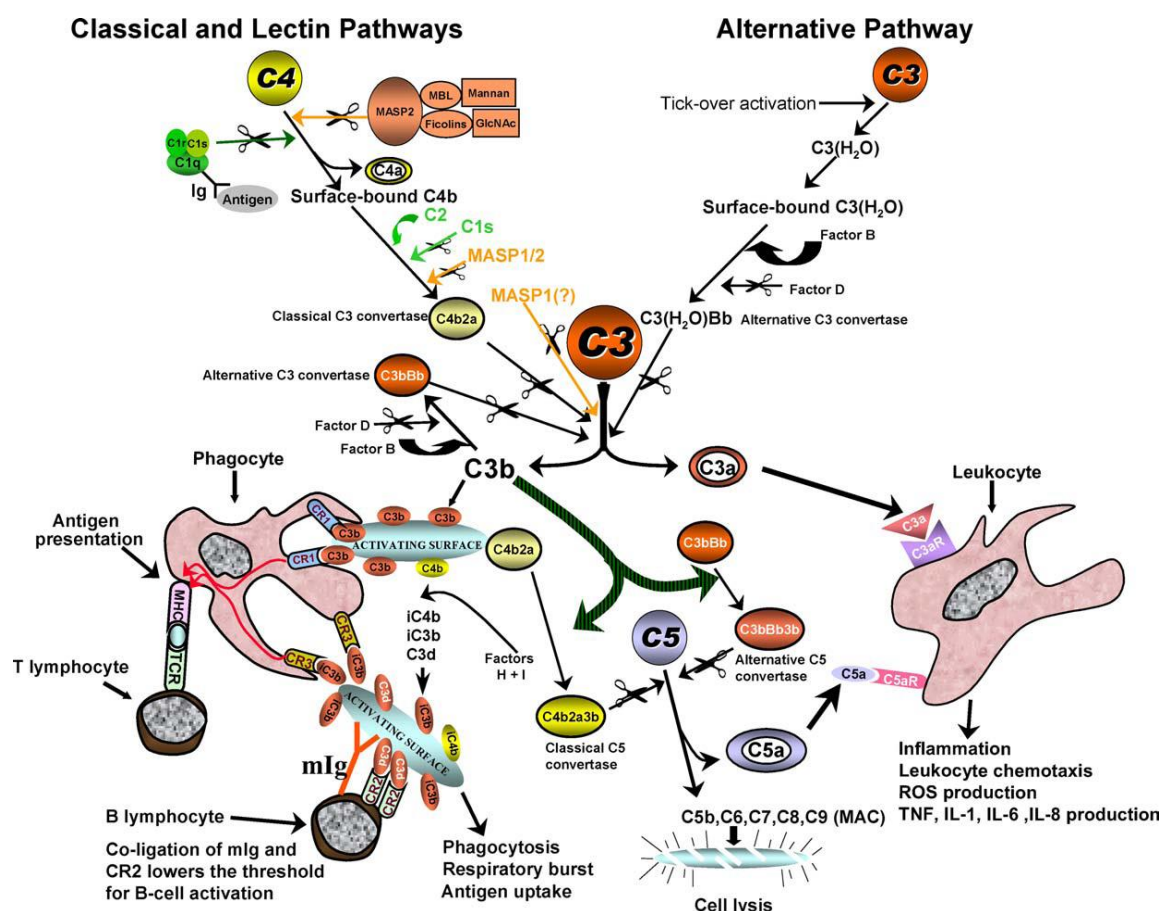


Figure 36 : Schéma des 3 voies d'activation du système du complément et fonctions impliquées (Boshra, Li et Sunyer, 2006)

Le TNF- $\alpha$  appartient à la famille des cytokines. Ces dernières sont des protéines produites par de nombreuses cellules immunitaires et qui ont pour rôle de contrôler : (1) l'intensité et la durée de la réponse immunitaire et (2) certains processus de différenciation et prolifération tissulaires (DeFranco, Robertson et Locksley, 2009). Le TNF doit son nom à ses effets cytotoxiques sur les cellules tumorales. La séquence du TNF- $\alpha$  n'ayant pas encore été identifiée chez nos espèces modèles, nous avons choisi d'étudier l'expression du TNF-R qui est le récepteur membranaire du TNF (Smith, Farrah et Goodwin, 1994). Le TNF-R intervient dans la régulation de l'apoptose et de l'inflammation (Wiens et Glenney, 2011). La mesure de son expression permet indirectement d'évaluer la modulation du système du TNF. Si une modulation de l'expression du TNF- $\alpha$  n'est pas forcément associée à une modulation de l'expression de son récepteur, on peut tout de même supposer qu'une modulation du TNF-R suggère une modulation du système du TNF dans son ensemble.

#### - Dosages du lysozyme (sang)

Le lysozyme est une enzyme présente notamment dans les lysosomes des neutrophiles et macrophages, libérée dans le sang. Il intervient dans la destruction des bactéries à Gram positif, avec un effet moindre sur les bactéries à Gram négatif, en s'attaquant au peptidoglycane présent dans la membrane de ces cellules (Skouras et al. 2003). Il va ainsi provoquer une lyse cellulaire. Des études ont montré que l'activité du lysozyme était sensible à la présence de contaminants dans l'environnement (Bols *et al.*, 2001a).

#### - Capacité de phagocytose (rein antérieur)

La phagocytose est l'un des mécanismes clef du système immunitaire. Elle se déroule en plusieurs étapes (Figure 37). Dans un premier temps le microorganisme est reconnu par les phagocytes par chimiotactisme ; une cellule immunitaire va alors y adhérer. Des pseudopodes vont ensuite englober totalement le corps étranger jusqu'à ce qu'il soit internalisé puis dégradé entraînant la formation d'espèces réactives de l'oxygène.

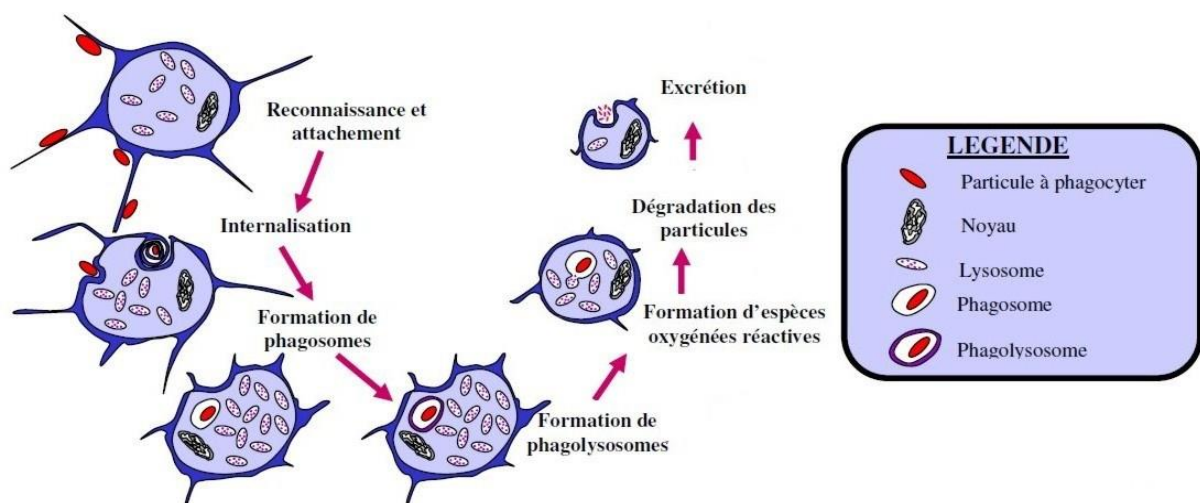


Figure 37 : les différentes étapes de la phagocytose (adapté de Bado-Nilles, 2008)

Il a été démontré à de multiples reprises, qu'en présence de polluants, la capacité de phagocytose des macrophages pouvait être diminuée. Cela a par exemple été montré pour des plies canadiennes, *Hippoglossoides platessoides*, mises en contact avec des sédiments contaminés, notamment aux PCBs, pendant 3 mois (Lacroix *et al.*, 2001).

#### - Métabolisme énergétique (muscle)

Le taux d'activité métabolique d'un organisme reflète la quantité d'énergie qu'il produit pour assurer ses fonctions vitales ; cette activité peut être considérée en tant que biomarqueur représentatif du statut physiologique d'un poisson (Plante *et al.*, 2005). En présence de xénobiotiques, de nombreux mécanismes physiologiques sont mis en place : pour maintenir l'homéostasie, pour la détoxification, la

protection et/ou la réparation des cellules ; tous ces processus nécessitant de l'énergie. L'évaluation de cette production énergétique globale, permet donc d'estimer le coût du maintien des fonctions vitales et de la réponse au stress (Beyers *et al.*, 1999).

Certains indicateurs du métabolisme énergétique pourraient être utilisés comme biomarqueurs pertinents en écotoxicologie. La Cytochrome C Oxydase (CCO) est l'enzyme terminale de la chaîne respiratoire mitochondriale et est responsable de 90% de la consommation en oxygène des cellules chez les mammifères (Xu, Charles et Moncada, 2005). La mesure de l'activité de la CCO pourrait donc être un bon indicateur du métabolisme aérobie (Lapointe et Couture, 2010). Des études ont montré que la présence de polluants comme le nickel ou du pétrole dispersé pouvait être associée à une augmentation de l'activité de la CCO; ces expériences suggèrent donc que l'exposition à des xénobiotiques peut entraîner un coût physiologique conséquent (Cohen, Gagnon et Nugegoda, 2005; Lapointe et Couture, 2010).

#### - Approche protéomique 2D (foie)

L'étude du protéome est complémentaire de celle du transcriptome puisque le profil protéique est influencé par le turnover des protéines (ie. synthèse et dégradation), les modifications post-traductionnelles et leur compartimentation cellulaire. En ce sens, les protéines sont plus représentatives des effets au niveau physiologique et plus proches de la réponse phénotypique.

Il existe de nombreuses méthodes permettant d'appréhender le protéome d'un organisme, d'un tissu ou d'une fraction subcellulaire (Compos *et al.*, 2012 ; Dowling et Sheehan, 2006 ; Martyniuk *et al.*, 2011 ; Rabilloud *et al.*, 2010 ; Monteoliva et Albar, 2004 ). Toutes reposent sur des principes communs : la première étape concerne l'extraction des protéines. Ces protéines sont digérées en fragments peptidiques (souvent par la trypsine) avant (« shotgun proteomic », « top down approach ») ou après séparation (« bottom up approach »). On distingue la protéomique sur gel (« gel based proteomic »), utilisant des techniques d'électrophorèse en 2 dimensions pour la séparation des protéines, des techniques sans gel (« gel free proteomic ») pour lesquelles la séparation se fait par chromatographie. Dans certains cas, les protéines peuvent être marquées avant (par fluorescence ou marquage isotopique) ou après (fluorescence, bleu de coomassie, nitrate d'argent après électrophorèse en 2 dimensions) séparation. Ce marquage permet de repérer les protéines ou peptides différenciellement présents dans une condition par rapport à une autre, et de les identifier.

L'identification des protéines se fait aujourd'hui principalement par spectrométrie de masse (Cravatt *et al.*, 2007). Différentes techniques existent. Elles reposent toutes sur un principe commun :

- les peptides sont fragmentés en ions volatiles de différentes masses (à partir d'une solution par excitation électrique en electrospray ESI (electrospray ionisation), ou à partir d'une surface solide par excitation LASER en MALDI (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization)).

- Les ions sont séparés en fonction de leur masse et leur charge (rapport m/z) dans l'analyseur (par sélection des masse dans un champ magnétique créé entre 4 électrodes en quadrupole ; ou par analyseur en temps de vol, TOF, Time of flight ; en utilisant leur mouvement rectiligne)

- l'abondance relative des ions en fonction de leur m/z est ensuite détectée, permettant de générer le spectre de masse.

Par l'utilisation de la spectrométrie de masse en tandem (Tandem mass spectrometry MS-MS), les ions détectés (ions précurseurs) sont isolés puis fragmentés. Le MALDI TOF-TOF permet cette fragmentation. Il est alors possible de déterminer la séquence en acides aminés des protéines, en comparant les spectres obtenus à la fragmentation théorique des peptides contenus dans les bases de données. Nous avons effectué ces comparaisons *in silico*, en utilisant les logiciels MASCOT et/ou PEAKS, alimentés par des bases de données regroupant les ESTs séquencées à ce jour chez les poissons plats. Les ESTs codant des protéines identifiées ont ensuite été ré-annotées par recherche d'homologie utilisant BLAST (Basic local alignment search tool) sur des bases de données protéiques non redondantes (nr, disponibles à [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)).

#### - Profils isotopiques (muscles et otolithes)

Les isotopes stables, notamment ceux de l'azote et du carbone peuvent être étudiés notamment en écologie pour estimer la position trophique d'un organisme (Minagawa et Wada, 1984). Dans la présente étude, les signatures isotopiques ne seront pas considérées comme des signaux en liens avec la structure trophique, mais plus comme des intégrateurs du régime alimentaire, mais aussi du taux d'activité métabolique de l'animal et des facteurs environnementaux. Les valeurs de  $\delta^{13}\text{C}$  et  $\delta^{15}\text{N}$

seront mesurées sur du muscle, celles de  $\delta^{13}\text{C}$  et  $\delta^{18}\text{O}$  étant estimées sur les otolithes (formations calcifiées de l'oreille interne du poisson). Rappelons que sur l'otolithe de poisson, la signature  $\delta^{18}\text{O}$  est fortement corrélée avec la température du milieu, alors que les variations saisonnières et ontogéniques de la signature  $\delta^{13}\text{C}$  pourraient être fortement liées au taux d'activité métabolique et pourraient ainsi devenir un outil très pertinent pour des études écophysiologiques (Kalish, 1991 ; Dufour *et al.*, 2007).

- Approche en génétique de populations : polymorphisme du gène AMPD1

L'AMPD1 est un gène qui code pour une enzyme catalysant la désamination de l'Adénosine MonoPhosphate (AMP) en Inosine MonoPhosphate (IMP) qui permet donc la régulation de la charge adénylique (A.E.C), et donc joue un rôle clé dans la gestion de l'énergie au niveau cellulaire. Il nous est apparu comme un gène candidat pertinent pouvant potentiellement subir des pressions de sélection dans les milieux contaminés où la réponse au stress des poissons se traduit par un coût métabolique conséquent (Marchand *et al.*, 2004).

Le polymorphisme de ce gène a été exploré par la technique HRM (High Resolution Melting Analysis). Ce gène se compose de 12 exons et 11 introns ; dans le cadre de cette étude seul le polymorphisme de l'exon 1 (160 pb) a été analysé, car c'est le seul exon ayant montré un polymorphisme robuste dans les populations naturelles.

#### III.4.3. Contamination expérimentale

Des flets juvéniles (0+) issus d'un élevage ont été contaminés via les aliments par un cocktail de HAP et PCB conçu pour refléter les niveaux de contamination trouvés dans la Seine (C1) et 10 fois ces niveaux (C2). Les prélèvements ont été effectués après 15 jours d'acclimation (T0), 14 puis 29 jours de contamination (T14 et T29), puis après 14 jours de décontamination (T43) (figure 38).

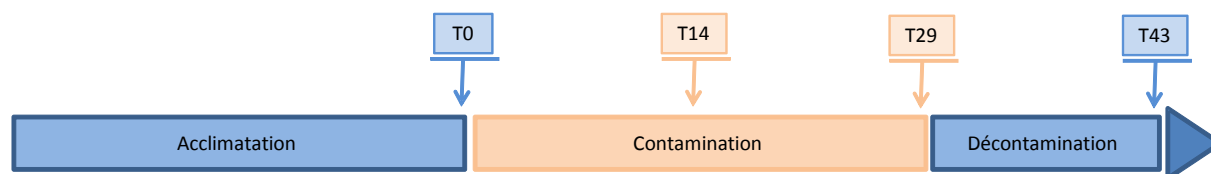


Figure 38 : Représentation schématique du plan expérimental.

Les contaminants ont été dosés dans les granulés (PCB et HAP) et dans les carcasses des poissons à T29 (PCB). Les résultats (tableau 1) montrent un rapport d'environ 10 entre les doses C1 et C2 dans les granulés comme dans les carcasses, ce qui indique que la voie de contamination était appropriée. Par ailleurs, la prise de poids (SGR) est corrélée avec la concentration en contaminants dans la condition C1 (confirmant qu'un poisson qui mange plus est plus contaminé).

Le cocktail à un niveau C2 entraîne une sur-expression des gènes CYP1A1 et BHMT après 29 jours de contamination ; cette induction est maintenue après les 14 jours de restauration. L'induction de ces deux gènes peut s'expliquer par la mise en place de processus de détoxification. De plus, l'étude en protéomique 2D a démontré, après 29 jours de contamination à un niveau C2, une augmentation de l'abondance de la BHMT et de la SHMT, 2 protéines impliquées dans le métabolisme de la méthionine. Cette augmentation pourrait être associée à une augmentation des défenses anti-oxydante (GPx) et suggère que la BHMT et de la SHMT seraient impliquées dans un cycle aboutissant à la production de glutathion.

Le maintien de la sur-expression des gènes CYP1A1 et BHMT après la phase de restauration peut indiquer que des PCBs ou des métabolites de HAPs sont encore présents dans les poissons en quantités suffisantes pour induire des processus de détoxification. Pour confirmer cette hypothèse, Véronique Loizeau a réalisé en février-mars 2013, des dosages complémentaires de PCBs dans les carcasses des poissons contaminés à un niveau C2 à 43 jours.

Tableau 7 : Concentrations de HAP & PCB dans les aliments : valeurs nominales (targeted) et valeurs réelles (measured)

	control with iso-octane	C1		C2	
	measured concentration (ng/g)	targeted concentration (ng/g)	measured concentration (ng/g)	targeted concentration (ng/g)	measured concentration (ng/g)
HAP :					
fluoranthene	2.3	210	189	2100	2072
pyrene	3.2	200	176	2000	1916
benzo(a)anthracene	0.7	70	49.6	700	640
chrysene	1.5	130	84.8	1300	1144
benzo(b)fluoranthene	2.3	170	116	1700	1501
benzo(k)fluoranthene	0.7	60	43.3	600	529
benzo(a)pyrene	1.3	60	42.1	600	517
indeno(1,2,3-cd)pyrene	nm	50	nm	500	514
benzo(ghi)perylene	0	50	54	500	435
$\Sigma$ HAP =	12	1000	754.8	10000	9268
CB :					
CB 28	0	5	4.2	50	47.1
CB 52	0.4	25	24.3	250	252
CB 101	1.6	50	43.8	500	470
CB 149	2.1	50	42.8	500	477
CB 118	1.1	50	41.7	500	465
CB 153	3.3	100	86	1000	939
CB 105	1.4	25	20.3	250	238
CB 138	2.6	100	79.4	1000	911
CB 156	1.2	25	20.3	250	218
CB 180	1.4	50	37.9	500	449
CB 170	1.5	25	17.7	250	212
CB 194	0	5	3.5	50	42.5
CB 126	0	5	3.9	50	46.9
$\Sigma$ PCB	16.6	515	425.8	5150	4767.5
total load of contaminants	28.6	1515	1180.6	15150	14035.5

Après 29 jours de contamination à un niveau C2, les niveaux de dommages à l'ADN sont significativement plus élevés (relativement aux poissons témoins) et corrélés avec les niveaux d'expression du CYP1A1 ( $R=0.964$ ,  $p<0.05$ ). Cela suggère que la production de métabolites des HAPs pourrait conduire à une augmentation des dommages à l'ADN (Lee et Steinert, 2003). De plus, l'approche en protéomique a mis en évidence une augmentation des défenses anti-oxydantes qui pourrait être associée à la présence de ROS, ces derniers pouvant également entraîner des dommages à l'ADN (Lee et Steinert, 2003). L'absence de dommages à l'ADN à 43 jours suggère que le niveau de métabolites et/ou de ROS est passé en dessous de la limite qui entraîne une génotoxicité mesurable par le test des comètes.

Les marqueurs immunologiques sont nettement affectés par la pollution, mais leurs réponses demeurent complexes à analyser. Ainsi le C3 et le TNF sont induits en présence de polluants après 29 jours à un niveau C2, alors qu'à l'inverse, la quantité de lysozyme est diminuée dès 14 jours de contamination à un niveau C1. Le système du complément et du TNF sont tous deux impliqués dans la réponse inflammatoire. Les polluants chimiques sont connus pour entraîner une inflammation chez les poissons (*e.g.* Pacheco et Santos, 2002), qui pourrait donc expliquer cette induction de C3 et TNF-R. Le lysozyme, quant à lui, est impliqué dans la lyse des bactéries ; aussi, une diminution de sa quantité suggère un effet immunotoxique des contaminants. De plus le lysozyme est le plus sensible des marqueurs immunitaires analysés dans cette étude, puisqu'il est modulé dès le niveau C1 à 14 et 29 jours.

Le niveau de contamination C1 n'induit aucune réponse en protéomique, relativement à la condition contrôle ; de plus, parmi les biomarqueurs mesurés, seuls 2 paramètres immunitaires sont modulés par le niveau de contamination C1 équivalent à celui de la Seine (le lysozyme à 14j et 29j et



le C3 à 29j). Pourtant plusieurs études ont observé sur des poissons en baie de Seine des dommages à l'ADN ou l'induction du CYP1A1 (*e.g.* Akcha, Vincent Hubert et Pfhof-Leszkowicz, 2003). Cette absence de réponse en situation expérimentale peut s'expliquer par la courte durée de la période de contamination (seulement un mois) et par l'absence de certaines substances dans notre cocktail. En effet, le mélange de HAPs et PCBs dont les effets sont explorés au laboratoire, ne peut évidemment pas simuler la complexité du mélange de polluants en Seine.

Pour conclure, cette expérience montre que les marqueurs employés sont bien modulés par la présence de contaminants dans notre situation expérimentale. Même si la réponse du système immunitaire reste complexe, il est clairement impacté par le stress chimique. Par ailleurs, l'existence d'un lien entre le CYP1A1 et les dommages à l'ADN est confirmée dans cette expérience.

L'étude protéomique par électrophorèse en 2 dimensions a montré chez les flets exposés au mélange complexe de HAP et PCB, la dérégulation du métabolisme énergétique, et du métabolisme de la méthionine. Des enzymes de détoxification et de défense anti-oxydantes sont également accumulées après 29 jours de contamination par la plus forte concentration de polluants dans les granulés. Les besoins en glutathion de la cellule semblent ainsi être augmentés à la fois pour la détoxification des xénobiotiques par la GST et en tant que défense anti-oxydante (GPx). L'hypothèse de l'implication de la BHMT et de la SHMT dans un cycle aboutissant à la production de glutathion peut être formulée

(figure 40).

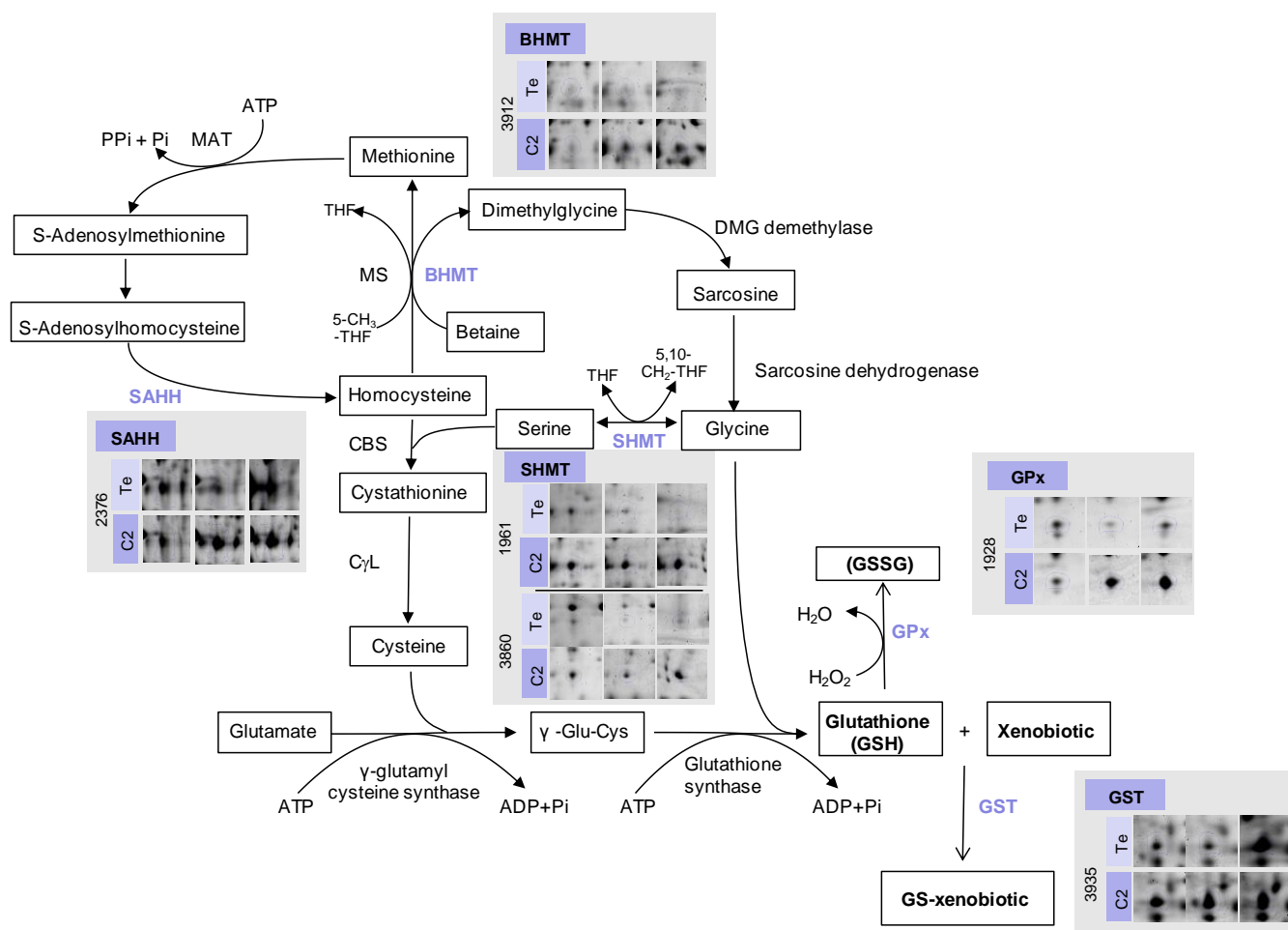


Figure 40 : Proposition d'un cycle impliquant BHMT, SHMT, SAHH, GST and GPx. Pour chaque protéine identifiée, les vues des spots présentées pour les conditions T29Te (animaux témoins au bout de 29 jours) vs T29C2 (animaux contaminés par C2 au bout de 29 jours). CBS, cystathionine beta synthase; CγL, cystathionine gamma lyase; MS, méthionine synthase; BHMT, betaine homocysteine

methytransferase; SHMT, serine hydroxymethyltransferase; GST, glutathione S transferase; GPx, glutathione peroxidase.

#### III.4.4. Etude in situ

Des juvéniles nés de l'année (young of the year : YOY ou 0+) et des juvéniles de plus de 1 ans (1+) ont été capturés dans 3 estuaires sur le secteur Manche (Figure 39) : la Tamar (Angleterre), la Seine, la Canche (France). L'estuaire de la Canche est un estuaire considéré dans de nombreuses études comme site de référence car présentant un faible niveau de contamination (*e.g.* Amara *et al.*, 2007; Amara *et al.*, 2009). La Seine est un estuaire considéré comme très pollué, présentant un mélange très complexe de polluants (HAPs, PCBs, métaux lourds,...) (Loizeau et Abarnou, 1995; Munsch *et al.*, 1996). La Tamar présente de fortes concentrations en métaux qui sont la conséquence d'anciennes activités minières (Langston *et al.*, 2003).



Figure 39 : Les trois estuaires échantillonnés dans le programme DIESE (Angleterre : Tamar ; France : Canche, Seine) et deux estuaires supplémentaires considérés dans l'approche en génétique (Vilaine et Mondego).

Les résultats sont présentés ici de manière synthétique (Tab. 8). Les corrélations existantes entre les paramètres moléculaires mesurés ont été calculées pour les estuaires de la Seine et de la Canche en 2010 pour les 2 classes d'âges (0+ et 1+).

En conditions expérimentales, l'activité de la CCO ne montrait pas de modulation nette liée à la présence de polluants ; par contre, en milieu naturel, l'activité de la CCO est différente entre les sites pour la cohorte 0+. Les flets de la Seine présentent en effet une activité de la CCO plus élevée relativement à ceux de la Canche ; elle pourrait refléter un surcoût énergétique pour les poissons contaminés, lié aux mécanismes de protection/réparation vis-à-vis des polluants.

Au niveau des processus de détoxification, l'expression du CYP1A1 ne semble pas être induite dans les sites contaminés. Nous suggérons particulièrement en Seine, un estuaire très pollué, que la mesure de l'activité EROD dépendante du CYP1A1 permettrait de mieux comprendre à l'avenir les processus de détoxification du flet. Par contre, on peut remarquer que la BHMT, qui est aussi liée à la détoxification, est induite en Seine pour la cohorte 0+.

Tableau 8 : Récapitulatif des résultats des différents biomarqueurs et indicateurs utilisés au cours de cette étude. Phago=capacité de phagocytose, indiv.=individu, reins a.=reins antérieur ou pronéphros, cyto=cytométrie, activ.=activité enzymatique par mesure d'absorbance ou de luminescence, ref. correspond à la valeur de référence pour les comparaisons, un ++ ou - - signifie que la valeur est plus de 2 fois supérieur ou inférieur à la valeur de référence.

indice mesuré		detoxification		système immunitaire			metabo.	indices de condition
		CYP1A1	BHMT	phago.	C3	TNF-R	CCO	CF
organe		foie	foie	reins a.	foie	foie	muscle	indiv.
technique		RT-PCR	RT-PCR	cyto.	RT-PCR	RT-PCR	activ.	indice
terrain - flet								
2009	Canche	ref.	ref.	n.m.	ref.	ref.	ref.	ref.
	Tamar	0	0	n.m.	0	+	0	-
	Seine	n.m.	n.m.	n.m.	n.m.	n.m.	+	-
2010	Canche 0+	0	0	ref	0	0	0	0
	Canche 1+	0	0	0	0	0	0	0
	Seine 0+	0	+	- -	+	+	++	0
	Seine 1+	0	0	- -	+	+	0	0

Parallèlement à notre expérience de contamination expérimentale, l'expression des gènes TNF-R et C3 est augmentée dans les estuaires pollués. L'expression du C3 pourrait être un indicateur moins sensible à la pollution métallique de la Tamar, puisqu'il n'est induit qu'en Seine alors que le TNF-R est activé en Seine et Tamar. L'hypothèse la plus probable est que la présence de polluants entraînant une inflammation, le système du complément et le TNF étant impliqués dans la réponse inflammatoire seraient alors activés. Par ailleurs, la capacité de phagocytose est diminuée aussi bien pour la cohorte 0+ que 1+ de la Seine par rapport à la Canche en 2010. Cela suggère que le stress chimique peut exercer un effet immunosuppresseur qui pourrait fragiliser à termes les populations très polluées, en les rendant moins résistantes aux pathogènes.

L'observation des profils obtenus par électrophorèse en 2 dimensions (Fig. 41) a montré une convergence dans les profils des poissons de la Tamar et de la Seine par rapport aux poissons de la Canche. Les profils observés dans les foies des poissons de la Tamar et de la Seine sont caractérisés par une dérégulation du métabolisme énergétique pouvant refléter une augmentation de la demande énergétique (augmentation de l'accumulation de MDH et FBPA). Cependant, la  $\beta$ -globine, protéine participant au transport de l'oxygène et accumulée en réponse à une augmentation de la demande énergétique, semble au contraire diminuer ici. Ces résultats pourraient être expliqués par la présence d'adaptation locale. En effet, des adaptations locales ont été décrites chez *P. flesus* dans certaines populations du nord de l'Europe vivant dans des environnements de salinité contrastée. Larsen *et al.* (2007) ont montré que, bien que la différenciation génétique soit faible entre les différentes populations étudiées, celles-ci montraient des capacités différentes notamment dans l'induction de l'ALAS, enzyme catalysant la première étape de la synthèse de l'hème. Par ailleurs, la GST, enzymes impliquée dans les mécanismes de détoxification de phase II et les défenses anti-oxydantes est également accumulée dans foies de poisson de la Seine et la Tamar. Enfin, une protéine de la superfamille des vitelline outer layer membrane protein 1 (VMO-I), est significativement accumulée (avec un facteur d'induction de 6.7) dans les foies des poissons de la Seine alors qu'elle est totalement absente chez les poissons de la Canche comme de la Tamar. Cette protéine, produite dans le foie, est



impliquée dans la vitellogenèse. Elle pourrait être un marqueur plus précoce que la vitellogénine de la présence de perturbateurs endocriniens dans le milieu.

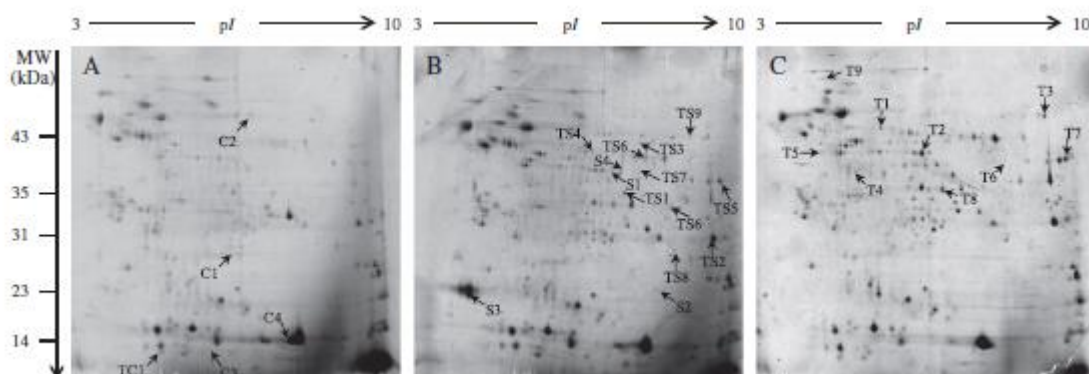


Figure 41 : Représentation de gels 2D de protéines hépatiques du flet dans trois estuaires : (A) La Canche, (B) la Seine et (C) la Tamar. Les spots de protéines différenciellement exprimées dans chaque estuaire sont identifiés par un numéro. Le poids moléculaire (MW) et le pI sont indiqués. Chaque gel est représentatif de quatre réplicats indépendants.

L'étude des microstructures des otolithes sur des sections transversales montrent que ces poissons sont soumis à de nombreux stress tout au long de leur vie de larves et de juvéniles, particulièrement chez les poissons plats caractérisés par des changements morphologiques importants lors de leur développement ontogénique. Pour l'année 2009, le taux de croissance estimé sur les otolithes des flets de la Canche ( $3,1 \pm 0,8 \mu\text{m/d}$ , sur 12 individus) est significativement plus faible que ceux observés pour les poissons de Seine ( $3,8 \pm 1,1 \mu\text{m/d}$ , sur 23 individus) et Vilaine ( $3,8 \pm 1,1 \mu\text{m/d}$ , sur 23 individus). On observe pour cette année, que les poissons de la Canche sont à la fois les plus petits et ont des taux de croissance journaliers les plus faibles. La population de flet la moins exposée au stress chimique présente donc dans cette étude une croissance journalière moyenne plus faible relativement aux populations soumises à des pollutions chroniques assez sévères. Ce résultat a priori surprenant s'explique vraisemblablement par le fait que d'autres facteurs que l'intensité du stress chimique peuvent agir sur la croissance dans les milieux naturels, ces derniers étant qualifiés communément en écotoxicologie de « facteurs confondants de l'environnement ».

Les compositions en isotopes stables du carbone et de l'azote ont été acquises sur les muscles des poissons des 3 estuaires durant 2009 et 2010. Elles sont potentiellement des indicateurs pertinents du taux d'activité métabolique d'un poisson et de son régime alimentaire. Des signatures différentes ont été observées entre les trois estuaires (Fig. 42). Les signatures en  $\delta^{13}\text{C}$  et  $\delta^{15}\text{N}$  des poissons de la Seine sont relativement stables en 2009, puis se dispersent en 2010. Les échantillons de la Canche de 2009 possèdent une signature très homogène pour les 2 traceurs avec des valeurs de  $\delta^{13}\text{C}$  les plus fortes des 3 estuaires ; on observe également pour cet estuaire une plus forte dispersion des individus en 2010, avec une baisse des valeurs du  $\delta^{13}\text{C}$ . Pour Seine et pour Vilaine on peut émettre l'hypothèse que les individus capturés en 2010 vs 2009, avaient des provenances géographiques plus diversifiées au sein du système estuarien. En Canche, les valeurs plus faibles en  $\delta^{13}\text{C}$  peuvent s'expliquer par des apports de matière organique continentale à signature faible détectées dans des poissons situés globalement plus en amont dans le système estuarien. Les poissons de la Vilaine se distinguent nettement par des valeurs élevées en  $\delta^{15}\text{N}$  et une très forte stabilité de leur signature au cours des années (Fig. 42) ; ces signatures suggérant que les flets de la Vilaine se situent à un niveau trophique supérieur à ceux des autres estuaires. Les signatures en  $\delta^{13}\text{C}$  légèrement plus élevées en Vilaine vs Seine, peuvent être liées soit à des sources de carbone différentes, soit à des différences de taux d'activité métabolique entre ces deux estuaires.

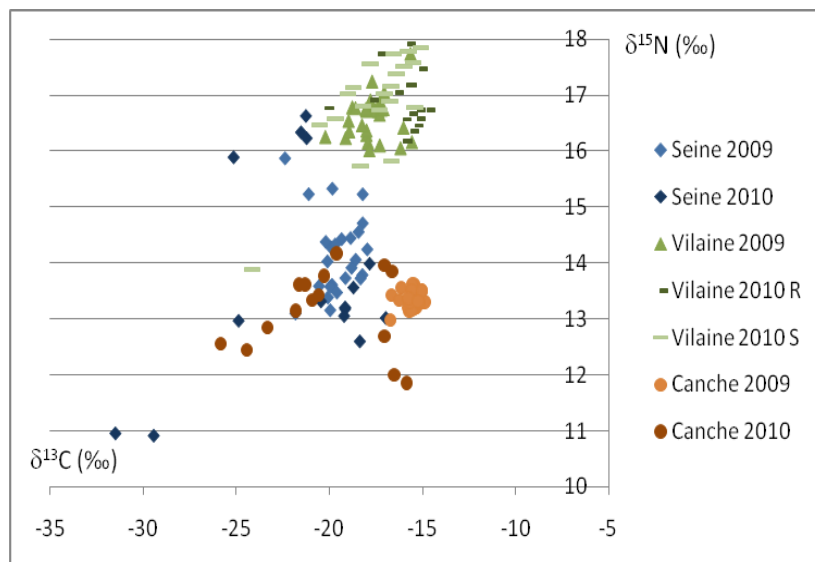


Figure 42 : Composition isotopique du muscle de flets de Seine, Vilaine et Canche en 2009 et 2010, et Vilaine printemps 2010 (poissons résistants et sensibles à l'hypoxie)

Dans les otolithes, les compositions en isotopes stables de l'oxygène et de carbone ont été mesurées (Fig. 43). On observe une forte différenciation entre les échantillons de Canche ( $\delta^{13}\text{C}$  et  $\delta^{18}\text{O}$  bas) et de Vilaine ( $\delta^{13}\text{C}$  et  $\delta^{18}\text{O}$  hauts) qui peut s'expliquer par les traits de vie et une occupation de l'habitat complètement différents pour ces 2 populations (environnement salé pour les flets de Vilaine vs dessalé pour ceux de Canche). Les variations en  $\delta^{18}\text{O}$  sont fortement reliées à la température de l'environnement du poisson, avec des températures plus élevées en Canche (habitat plus amont) qu'en Vilaine (habitat plus aval). Par ailleurs les signatures otolithe en  $\delta^{13}\text{C}$  permettent de différencier nettement les 3 populations, beaucoup mieux que pour les signatures muscle. Cela pourrait indiquer que les sources de carbone diffèrent et/ou que les taux métaboliques sont différents entre ces estuaires. Plus généralement, la forte relation linéaire négative détectée entre le taux d'activité métabolique d'un poisson et la valeur du  $\delta^{13}\text{C}$  obtenue dans ses otolithes (Dufour *et al.*, 2007) suggèrent fortement un accroissement de la température moyenne de l'environnement corrélé avec une augmentation du taux métabolique des poissons dans le sens : Vilaine, Seine, Canche.

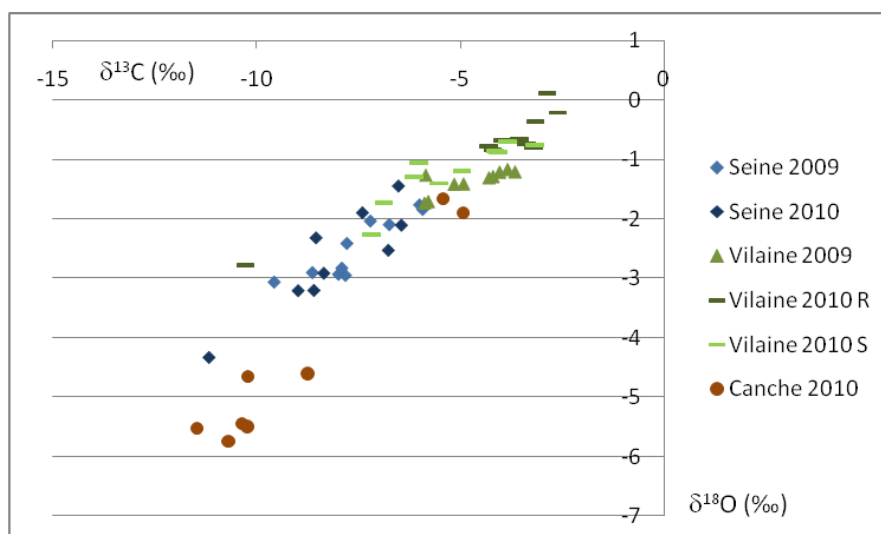


Figure 43 : Composition isotopique des otolithes de flets de Seine, Vilaine et Canche en 2009 et 2010, et Vilaine 2010 résistants « R » et sensibles « S » à l'hypoxie.

L'analyse microchimique et particulièrement les profils de Strontium et de Baryum, le long des otolithes, de la naissance à la capture des poissons, souligne des stratégies d'occupation de l'espace différentes entre les estuaires. En effet des concentrations élevées en Sr indiquent une phase marine et les plus faibles une phase estuarienne ; de façon opposée, les fortes concentrations en Baryum sont à relier à des apports continentaux et les faibles à des phases marines.

On observe en Canche et Vilaine, des naissances en milieux marins (Sr fort), contrairement à la Seine où les naissances sont estuariennes, puis un passage en eau dessalée (Sr plus bas) qui commence après la métamorphose, matérialisée par une ligne rouge (Fig. 44). Ensuite, les flets en Canche ont une vie essentiellement localisée en eau dessalée, voire douce, aussi bien pour les 0<sup>+</sup> que les 1<sup>+</sup>. En effet sur les 19 poissons analysés 17 présentent des profils avec signatures eau douce pendant toute leur vie. Les juvéniles de la Vilaine présentent une vie essentiellement marine, avec une phase présentant un niveau de Sr légèrement plus bas, indiquant une remontée des poissons dans la partie amont légèrement dessalée de l'estuaire qui est limité par un barrage situé à 12 km de l'embouchure. Les juvéniles de la Seine présentent une partie conséquente de leur cycle en eaux très dessalées, puis migrent vers des eaux plus salées. Ces différentes stratégies d'occupation de l'espace par le flet juvénile en estuaires, pourraient être mise en relation avec les taux de croissance différentiels observés entre Vilaine-Seine vs Canche ; la présence continue des poissons en eau peu salée dans ce dernier système pourrait expliquer leur faible croissance relativement à des milieux méso-halins permettant une optimisation de la fonction de croissance.

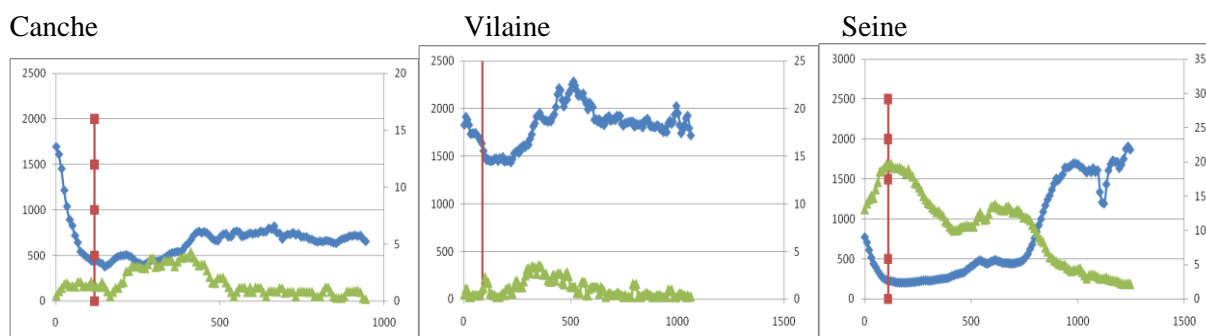


Figure 44 : Concentrations en Strontium en bleu (échelle de gauche en ppm), et en Baryum en vert (échelle de droite en ppm), le long d'un transect en  $\mu\text{m}$ , du nucleus (naissance) à la capture, pour des poissons issus de Canche, Vilaine et Seine en 2009. La ligne droite rouge indique la zone de métamorphose.

Des challenges hypoxiques expérimentaux ont été menés au laboratoire sur des flets issus de Vilaine en 2010 (soumis à une hypoxie plus ou moins chronique dans leur estuaire en saison estivale) ; ils ont conduit à la détermination de deux groupes de poissons, S « sensibles » ou R « résistants » vis-à-vis de l'hypoxie. La comparaison des signatures isotopiques des muscles entre R et S de Vilaine 2010 n'indiquent aucune différence pour le  $\delta^{15}\text{N}$ , par contre des différences à la limite de la significativité ont été obtenues pour les  $\delta^{13}\text{C}$  ( $p = 0.054$ ) (Fig. 42). Ces résultats sont confirmés par les analyses en isotopes stables sur les otolithes qui intègrent la vie entière du poisson ; on observe alors une différence significative pour le  $\delta^{18}\text{O}$  et  $\delta^{13}\text{C}$  entre R et S (Fig. 43), les résistants présentant des signatures plus élevées. Ces analyses indiquent que le niveau trophique est probablement identique pour les deux groupes R et S, mais que les sources de carbones divergent et/ou que les taux métaboliques sont différents.

Les profils en éléments traces sur les flets de Vilaine 2010 indiquent deux types de stratégies d'occupation de l'estuaire, non détectées en 2009 (Fig. 44). Certains poissons sont essentiellement marins, alors que d'autres ont une phase dessalée qui se situe après la métamorphose et qui a la même durée pour tous ces poissons (400µm). 3/8 des profils de poissons sont typés « marins » pour les sensibles (concentrations en Sr élevées et en Ba faibles), et 5/10 pour les flets résistants. Ces résultats suggèrent donc d'écarter la thèse des variations du  $\delta^{13}\text{C}$  entre R et S liées à des sources de carbone différentes ; ils permettent de privilégier la thèse d'une physiologie différentielle entre les deux groupes de poissons, les individus résistants à l'hypoxie présentant un taux métabolique plus faible que les sensibles.

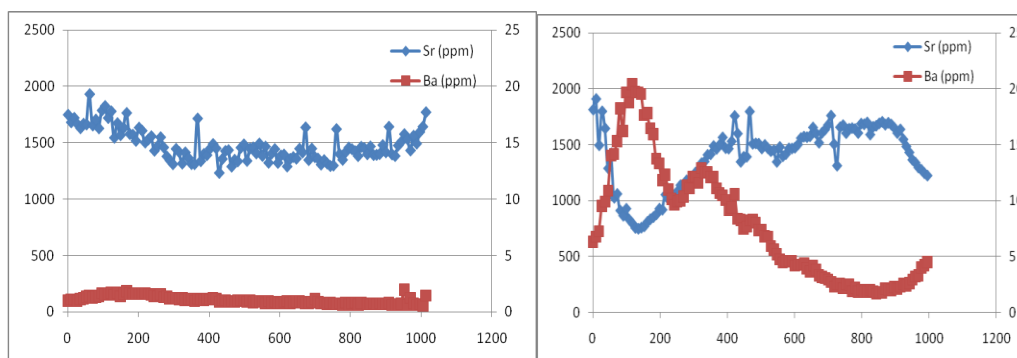


Figure 45 : Deux types de profils en Sr et Ba sur des transects (en µm) d'otolithes, entre nucleus et bord, pour des poissons de Vilaine 2010 (profil marin à gauche vs profil dessalé à droite)

La variabilité du gène AMP-deaminase isoforme 1 (impliqué dans le métabolisme énergétique) a été étudiée sur les 4 populations de flets précédentes (Tamar, Canche, Seine, Vilaine) ainsi que sur une population considérée comme un « outgroup », prélevée dans l'estuaire du Mondego au Portugal. 40 flets juvéniles ont été échantillonnés par estuaire et donc génotypés.

La diversité génétique intra-populationnelle et particulièrement l'hétérozygotie observée ( $H_o$ ) a été étudiée ; ceci nous a permis de mettre en évidence le pattern suivant :

$H_o$  Seine (0,480) >  $H_o$  Tamar (0,413) >  $H_o$  Mondego (0,358) >  $H_o$  Vilaine (0,301) >  $H_o$  Canche (0,29)

On peut détecter une corrélation positive entre le niveau de pollution des eaux et la diversité génétique. Nous émettons l'hypothèse qu'une pression de sélection des contaminants chimiques s'exerce sur directement ou indirectement sur le gène AMPD dans les populations naturelles de flet en estuaires ; les génotypes les plus hétérozygotes présenteraient potentiellement une meilleure capacité de « résistance » face au stress chimique.

La diversité génétique inter-populationnelle a été analysée par MDS (multidimensional scaling) ; elle met en évidence une différenciation génétique significative entre les estuaires les plus pollués : Seine & Tamar vs les estuaires modérément ou peu contaminés : Vilaine, Mondego, Canche (Fig. 46).

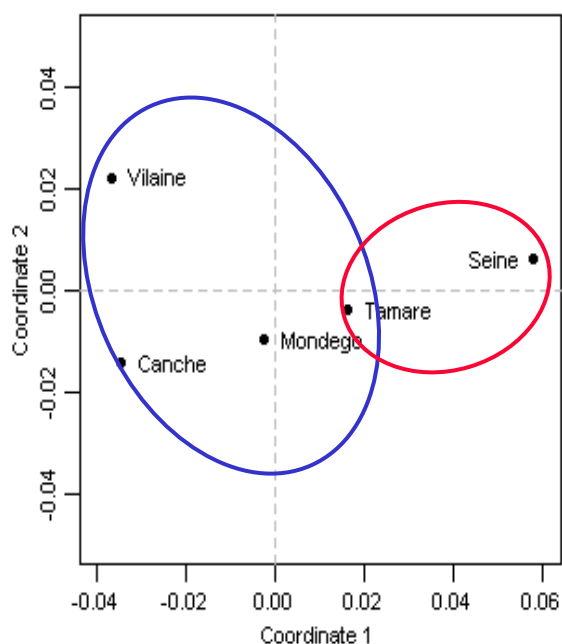


Figure 46. Etude de la différenciation génétique entre les populations (MDS)

#### *III.4.4. Perspectives en termes d'outils pour la recherche et pour le monitoring des milieux naturels impactés par le stress chimique*

Globalement il ressort de ce travail que les biomarqueurs du système immunitaire sont particulièrement pertinents en écotoxicologie, en conditions contrôlées, comme en milieux naturels. On remarque notamment que l'activité du lysozyme est un des marqueurs les plus sensibles au stress chimique ; cette activité pouvant être mesurée dans le sang mais aussi potentiellement dans le mucus. La sur-expression des gènes C3 et TNF-R est également confirmée en expérimentation et dans la nature. La capacité de phagocytose est clairement affectée par les polluants dans les populations en milieux naturels. Globalement on peut donc considérer que les modifications des capacités immunitaires des poissons exposés au stress chimique peuvent potentiellement : (1) augmenter leur sensibilité face aux pathogènes, (2) conduire à une perte de fitness au sein des populations naturelles. Les altérations du système immunitaire devront être approfondies dans le futur, par des challenges bactériens ou viraux mis en œuvre sur des populations polluées vs des populations issues de « systèmes de référence ».

Suite aux travaux en protéomique réalisés au cours de cette étude, la dérégulation du métabolisme énergétique, l'induction de mécanismes anti-oxydants et de détoxification ont été observés. Ces mécanismes ont déjà été beaucoup étudiés et leur potentiel comme biomarqueur évalué. Au contraire, le potentiel comme biomarqueurs de la VMO-I et des enzymes impliquées dans le cycle de la méthionine, notamment la BHMT, est à ce jour très peu étudié mais semble, selon les résultats présents, très prometteurs.

Une autre approche originale de cette étude a été de considérer les marqueurs isotopiques (sur muscle et otolithe) et la microchimie (sur otolithe) ; ces marqueurs étant massivement utilisés en écologie, mais encore très peu explorés dans le contexte des travaux en écotoxicologie.

La variation interannuelle des signatures isotopiques notamment dans le muscle des poissons, dans un même estuaire, nous a permis ainsi de détecter que certaines années, les poissons capturés pouvaient être issus de secteurs beaucoup plus diversifiés de l'estuaire. Cette dispersion pourrait

conduire à une augmentation forte de la variabilité interindividuelle des biomarqueurs, la biodisponibilité des polluants pouvant être fortement liée aux facteurs hydroclimatiques locaux (salinité, température, charge en matière organique,...).

Les signatures isotopiques au niveau de l'otolithe se sont aussi révélées très pertinentes en tant que proxys de la température environnementale ( $\delta^{18}\text{O}$ ) et de l'activité métabolique du poisson ( $\delta^{13}\text{C}$ ) ; elles nous permettent d'avoir une vision globale et comparée de l'environnement thermique et du statut métabolique des poissons, dans les systèmes naturels. Les marqueurs microchimiques (Sr, Ba) se sont révélés très informatifs pour nous permettre de détecter les effets probables de facteurs confondants dans les milieux naturels, non liés directement au stress chimique, mais pouvant affecter la réponse de certains biomarqueurs. Ainsi, la faible croissance moyenne journalière des poissons dans l'estuaire le moins impacté par le stress chimique est très probablement associée à la présence des juvéniles dans la partie nettement plus dessalée de ce système, relativement à leurs homologues situés plus en aval dans les deux estuaires pollués. Nous pensons donc que l'utilisation de ces marqueurs pourrait être développée en écotoxicologie, pour mieux comprendre le fonctionnement des populations dans les systèmes naturels particulièrement complexes que sont les estuaires.

Enfin, l'intégration de la génétique de populations en écotoxicologie peut devenir très pertinente :

- 1) au niveau du monitoring environnemental, en étudiant notamment les corrélations entre la variabilité génétique de différents gènes candidats, en relation avec le niveau de pollution dans les systèmes naturels ;
- 2) au niveau recherche fondamental, pour détecter des performances physiologiques différentielles entre les individus portant certains allèles ou génotypes en milieux pollués, et donc explorer les bases mécanistiques de la résistance aux polluants (Wirgin *et al.*, 2011 ; Marchand *et al.*, 2013).

## **IV. SURVEILLANCE DES EFFETS *IN SITU* A TRAVERS L'ETUDE DE LA REGION MANCHE**

### **IV.1. Introduction**

Depuis une trentaine d'année, les efforts de la recherche en écotoxicologie ont conduit au développement et à la caractérisation, plus ou moins fine, de différents indicateurs biologiques tels que les biomarqueurs et les bioessais, dans l'objectif d'une application à la surveillance des milieux aquatiques. Si le récent arrêté transposant en droit français la Directive Cadre Stratégie pour le Milieu Marin (arrêté du 17 décembre 2012 portant sur la définition du bon état écologique dans les eaux marines) propose l'utilisation de biomarqueurs liés à des fonctions clé pour les organismes ou à des mécanismes d'action spécifiques des polluants, il n'en va pas de même pour les masses d'eaux continentales pour lesquelles la Directive Cadre sur l'Eau (2000/60/EC) articule la surveillance autour de trois programmes utilisant des approches chimiques et biocénétiques. Ainsi, les outils biologiques ne sont pas utilisés pour la surveillance réglementaire des masses d'eau continentales même si différents travaux mettent en avant le fort potentiel et l'intérêt de ces indicateurs en complément voire à la place des approches conventionnelles.

Cette action a pour objectif de mettre en lumière l'intérêt d'une batterie de biomarqueurs mesurée dans la zone INTERREG France-Manche-Angleterre en proposant une évaluation des effets induits par cette contamination sur les organismes. Les travaux consistent à fournir, en utilisant une suite de réponses biologiques et des outils analytiques, à partir de plusieurs niveaux de complexité biologique, une image de la qualité des systèmes aquatiques. Dans ce contexte, nous nous pencherons en particulier sur la contamination des écosystèmes aquatiques et de ses effets sur les organismes induits par des perturbateurs endocriniens (œstrogènes, androgènes et anti-androgènes), des composés génotoxiques et immunotoxiques. Pour répondre à cet objectif, plusieurs sous-actions ont été réalisées:

1. le développement d'outils et de méthodes d'études des biomarqueurs incluant la validation et l'assurance-qualité des mesures ;
2. l'étude d'un lien entre l'exposition, les biomarqueurs et les paramètres physiologiques ;
3. le développement d'un outil de synthèse des données multi-biomarqueurs permettant une meilleure prise en main de ces outils par les gestionnaires de l'environnement ;
4. la mesure, sur des mollusques et poissons sauvages, de différents biomarqueurs préalablement développés et caractérisés en laboratoire afin de conduire à une cartographie de la zone d'étude.

### **IV.2. Identification de gènes de référence pour la quantification des biomarqueurs par qPCR**

À ce jour, le gène de référence universel idéal, c'est-à-dire exprimé de façon stable dans différentes circonstances physiologiques n'a pas été décrit. Ainsi, l'utilisation d'un gène de référence unique peut conduire à des erreurs et il est conseillé d'utiliser des gènes de référence multiples pour le calcul d'un facteur de normalisation fiable. Plusieurs gènes de référence appropriés dans les tissus humains ont été identifiés et validés, cependant les études comparant la stabilité de l'expression de gènes chez les espèces non-vertébrés, y compris les mollusques, sont relativement peu nombreuses. Plusieurs algorithmes mathématiques sont disponibles pour évaluer l'adéquation des gènes de référence après normalisation pour les expériences de quantification par qPCR. GeNorm et NormFinder, par exemple, sont des applications librement disponibles pour l'évaluation des gènes de référence de stabilité.

Dans le cadre de nos travaux relatifs à la variation de l'expression des gènes clés impliqués dans la perturbation endocrinienne, nous avons comparé la stabilité de six gènes de référence (bêta

actine alpha tubuline, ARN ribosomal 18S, ARN ribosomal 28S, allongement factor-1 alpha et l'hélicase DEAD) dans les moules, *M. edulis*, à différents stades de la gamétogenèse et au cours d'expositions à un œstrogène modèle. Les logiciels GeNorm et NormFinder ont été utilisés et nous avons étudié l'effet de la sélection de gènes de référence sur l'interprétation des données générées par qPCR. Les gènes de référence les plus stables pour les moules (dans ces circonstances), EF1 et EF1/TUB en combinaison, ont révélé une diminution significative des niveaux relatifs d'ARNm codant pour ER dans les moules matures par rapport aux moules en développement précoce après exposition estradiol. Cependant la comparaison des différentes combinaisons de gènes de référence révèle que les résultats expérimentaux sont très dépendants du gène de référence choisi et que les résultats finaux peuvent être opposés selon cette sélection.

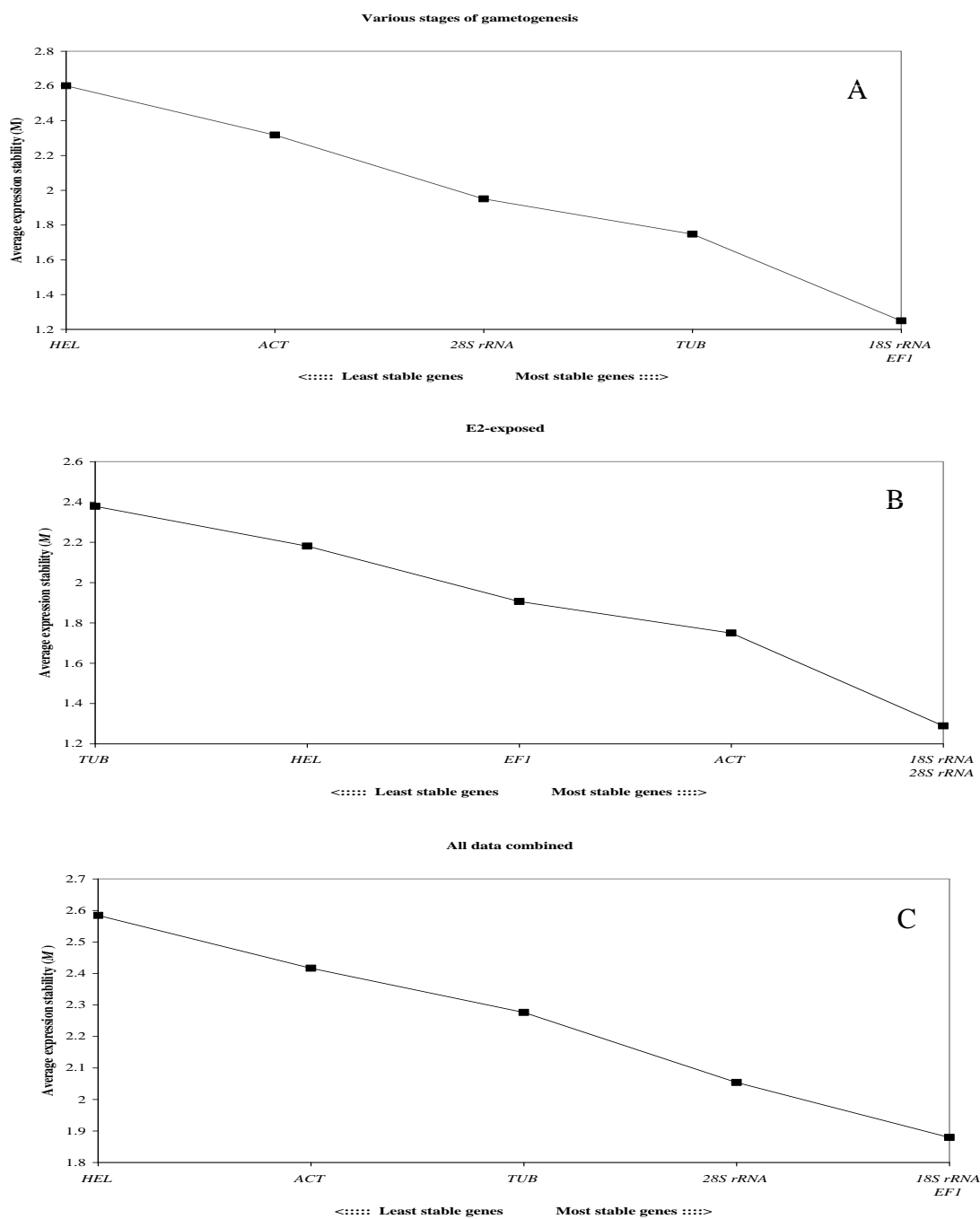


Figure 47 : Niveaux d'expression relative du gène codant pour le récepteur à œstradiol (ER) après normalisation dans des moules matures ou en développement (n=8). Les moyennes sont indiquées  $\pm$  SEM. La présence de différences significatives est indiquée par les astérisques \*\*:  $p < 0.01$ , \*:  $p < 0.05$ .



En conclusion, nos résultats indiquent qu'une évaluation préliminaire de la stabilité génétique est requise avant chaque quantification par qPCR pour obtenir les résultats fiables.

#### IV.3. Identification d'une nouvelle espèce sentinelle : Le chabot (*Cottus sp.*)

La distribution longitudinale des poissons dans les cours d'eau ainsi qu'au sein des bassins hydrographiques rend impossible l'utilisation d'une seule et unique espèce sentinelle pour la mise en œuvre d'une approche multi-biomarqueurs. De plus, l'utilisation d'espèces reconnues comme sentinelles comme par exemple le gardon (*Rutilus rutilus*), le goujon (*Gobio gobio*), le chevaie (*Leuciscus cephalus*) ou encore l'épinoche (*Gasterosteus aculeatus*) ne garantit pas une couverture optimale des réseaux de surveillance. Pour pallier cette lacune, un des objectifs de cette action était de caractériser le potentiel d'une nouvelle espèce sentinelle : le chabot, pour mesurer un ensemble de biomarqueurs. En effet, le chabot est un poisson benthique largement distribué dans les écosystèmes aquatiques continentaux européens présentant des niveaux de contamination variés. Sa petite taille et les bonnes connaissances de sa biologie rendent plus facile la mise en œuvre de la caractérisation de biomarqueurs en conditions contrôlées. De plus, son utilisation dans un contexte de biosurveillance a déjà été montrée comme pertinente (Bucher and Hofer, 1993, Bucher, et al., 1992, Hofer, 1996). L'atteinte de cet objectif est passée par le développement d'une approche multi-biomarqueurs chez le chabot ainsi que l'identification d'un marqueur androgéno-régulé et sa caractérisation en tant que biomarqueurs.

Ce travail a débuté par l'étude de la reproduction des populations sauvages de chabots. En effet, le chabot présentant un mode de reproduction complexe, cette étape nous a semblé être un pré-requis indispensable avant d'envisager l'utilisation de cette espèce en tant qu'indicateur de la contamination par des perturbateurs endocriniens. Cette première étape a permis de confirmer l'existence de deux stratégies reproductives chez les chabots (annuelle ou saisonnière) dans notre zone d'étude inhérente au programme INTERREG et a mis en évidence les facteurs environnementaux qui en sont responsables. Par ailleurs, cette étude a permis la confirmation d'une hypertrophie dans le rein des chabots mâles en période de reproduction et la mise au point d'une méthode histologique permettant de la quantifier : la mesure de l'épaisseur de l'épithélium rénal (KEH ; voir partie 2 du rapport).

Un travail préalable d'optimisation et de validation des dosages biochimiques chez le chabot a été effectué. Il a consisté à transposer chez le chabot les différentes méthodes de dosages colorimétriques ou fluorimétriques des biomarqueurs sélectionnés, selon des protocoles développés préalablement au laboratoire sur d'autres modèles tels que la truite arc-en-ciel, *Oncorhynchus mykiss* (Aït-Aïssa et al., 2003), le bar, *Dicentrarchus labrax* (Deviller et al., 2005), l'épinoche à trois épines, *Gasterosteus aculeatus* (Sanchez et al., 2007) et le chevaie, *Leuciscus cephalus* (Hinfray et al., 2010).

La validation des différents dosages passe par la détermination de plusieurs paramètres.

- Les limites de détection (LD) et de quantification (LQ) sont respectivement définies comme étant la plus petite quantité de substance ou activité enzymatique de l'échantillon à doser pouvant être détectée et, la plus petite quantité de substance ou activité enzymatique pouvant être dosée par la méthode. Ces limites sont déterminées à partir des vitesses réactionnelles mesurées pour les « blancs » selon les relations suivantes :  $LD = m_{\text{blancs}} + 3SD$   $LQ = m_{\text{blancs}} + 10SD$

où  $m_{\text{blancs}}$  correspond à la moyenne des « blancs » et SD l'écart type associé.

- La zone de linéarité de la droite d'étalonnage qui est définie par la concentration maximale testée qui permet d'obtenir une relation linéaire entre le signal mesuré et la concentration ou l'activité du standard.

- La charge protéique ou la dilution optimale de l'échantillon qui permet de réaliser le dosage dans des conditions pour lesquelles le signal obtenu est proportionnel à la dilution de l'échantillon. Ce paramètre est intimement lié à la nature de l'échantillon et doit donc être redéfini pour chaque espèce mais également pour chaque type d'organe utilisé.

En particulier, un test ELISA a été spécifiquement développé chez le chabot pour quantifier la vitellogénine plasmatique (VTG). Pour ce faire, de la VTG a été purifiée à partir de chabots induits par des injections d'E2 selon Brion et al. (Brion et al. 2000). La figure 50 montre les courbes de dilution obtenues par dilution en série des plasmas de témoins mâles et femelles et des chabots mâles et femelles induits. Un très bon parallélisme a été observé entre les courbes de dilution et de la courbe standard. Dans cette figure, il est également montré les courbes de dilution obtenues par dilution en série des plasmas, des extraits musculaires et de rein issus de chabots contrôles mâles et femelles, de poissons zèbre, de goujons et d'épinoches. Aucune réponse n'est détectée dans le plasma des épinoches mâle et femelle, des goujons et es poissons zèbres mâle quelle que soit la dilution tandis que le plasma de femelles de poissons zèbres montre une réponse limitée. Concernant les autres tissus utilisés (muscles et reins), seuls les homogénats de rein de chabots mâles et femelles ont montré une réponse limitée. Le tableau 9 montre la précision de la méthode ELISA (variations intra- et interspécifiques) et présente les limites de détection et de quantification. Le test se caractérise par une faible limite de détection et de quantification (8.2 un 13,9 ng / mL, respectivement) et présente une bonne précision. Les coefficients de variation pour la répétabilité sont de 9,2; 15,4 et 17,3 respectivement pour l'EC50, l'EC20 et l'EC10 et les coefficients de variation de la reproductibilité sont de 33,9; 43,6 et 32,6 respectivement pour la CE 50, l'EC20 et l'EC10.

Tableau 9 : Caractéristiques de l'ELISA permettant le dosage de vitellogénine de Chabot. CV: moyenne des coefficients de variation.

Paramètres	EC50	EC20	EC10
Concentration en Vtg (ng/ml)	28,9	13,9	8,2
CV intra-assay (%)	9,2	15,4	17,3
CV inter-assay (%)	33,9	43,6	32,6

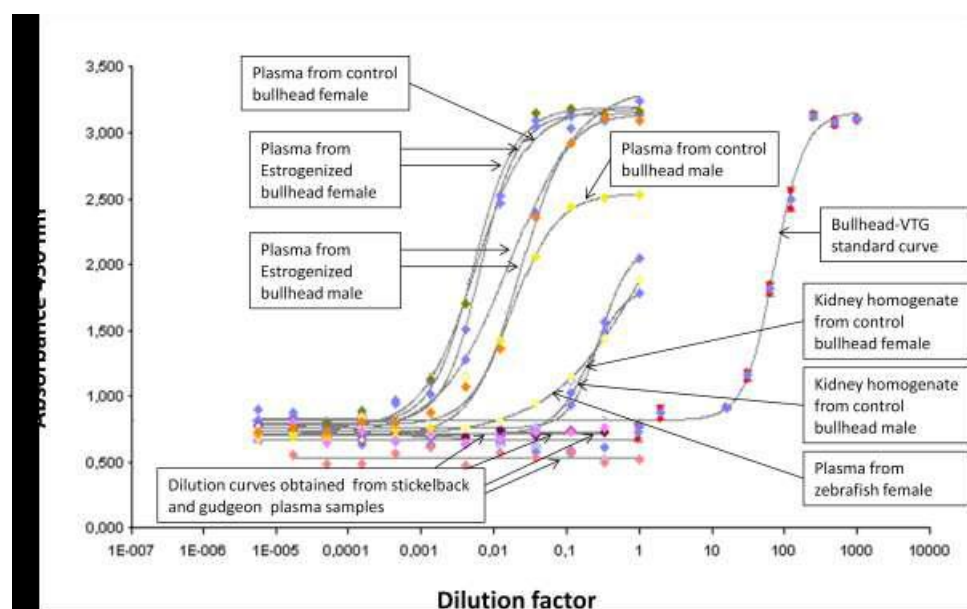


Figure 50: Courbes dose-réponses obtenues par dilution en série de plasmas de chabots mâles et femelles traités à l'œstradiol (0.5 µg EE2/L), de plasma contrôles, de plasmas de goujons mâles et femelles et d'épinoches et de plasmas de poisson zèbre ou d'extraits de rein de chabots contrôles.

Ainsi, ce travail montre le potentiel du chabot pour mesurer un ensemble de biomarqueurs incluant un indicateur d'exposition aux androgènes (voir partie 2 du présent rapport). Toutefois, des expérimentations complémentaires ont montré que la reproduction de cette espèce est complexe et qu'il est nécessaire de prendre en compte le régime hydrologique des cours d'eau dans l'interprétation des résultats notamment du fait des interactions avec le système reproducteur. Ainsi, des travaux complémentaires doivent être mis en œuvre afin de mieux caractériser la réponse de ces indicateurs et les interférences avec des facteurs biotiques et abiotiques. De plus, l'exploitation récente des données de surveillance des peuplements piscicoles réalisée par l'ONEMA montre que le potentiel d'autres espèces pourrait être investigué en lien avec leur large distribution dans les réseaux hydrographiques ; c'est par exemple le cas du vairon.

#### **IV.4. Utilisation de biomarqueurs biochimiques et physiologiques pour évaluer les effets des contaminants chimiques sur les juvéniles de poisson marin**

Essayer de relier les réponses d'un biomarqueur à des niveaux croissants d'exposition des organismes aux polluants, à la fois au laboratoire et en condition *in situ*, représente une démarche primordiale pour améliorer la pertinence écologique des procédures écotoxicologiques (Depledge et al., 1995). Comme beaucoup d'effets toxiques interviennent initialement à un niveau subcellulaire, il y a eu une utilisation massive des biomarqueurs biochimiques qui permettent de déterminer les mécanismes responsables des altérations cellulaires observées (Schlenk et al., 1996). Parmi les biomarqueurs biochimiques décrits dans la littérature, les paramètres de biotransformation tels les activités EROD (Ethoxyrésorufine-O-dééthylase) et GST (Glutathion-S-transférase) sont fréquemment utilisés dans l'évaluation des risques associés aux contaminants (Sanchez et al., 2008). La biotransformation des composés organiques est une étape nécessaire afin de faciliter leur détoxification et élimination (Gravato and Santos, 2003). Les enzymes antioxydantes sont également communément utilisées afin de comprendre les effets toxiques entraînés par les xénobiotiques (Sanchez et al., 2005; Oliveira et al., 2008). Beaucoup de polluants exercent leurs effets à travers la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS). Le rôle du système antioxydant est de protéger les cellules contre ce stress oxydatif. De ce fait, la mesure des composants impliqués dans ces mécanismes de défense permettrait de faciliter la détection d'une exposition à un polluant (Bilbao et al., 2010). Bien que le rôle des biomarqueurs biochimiques en tant que marqueurs précoces de toxicité est reconnu, il est parfois difficile de comprendre leur signification à des niveaux plus élevés de l'organisation biologique. En effet, malgré leur réponse rapide et sensible à une exposition, les biomarqueurs biochimiques peuvent avoir une pertinence écologique questionnable (Castro, 2004).

Les réponses physiologiques aux contaminants chimiques ont souvent été ignorées par les écotoxicologues car elles sont considérées comme trop généralistes et trop difficiles à mesurer en routine (Depledge et al., 1995). Cependant, des évidences émergent actuellement quant aux avantages qu'elles représentent de pouvoir intégrer la somme des réponses imposées par les polluants et les facteurs environnementaux naturels. Les biomarqueurs physiologiques des juvéniles de poisson, comme la croissance ou le stockage lipidique, pourrait fournir l'opportunité d'intégrer les réponses biochimiques et cellulaires d'un organisme avec une fitness altérée. Ces processus sont fonction de la survie des juvéniles de poisson et ainsi ils contribuent au renouvellement des populations. En effet, une réponse fréquemment observée chez un organisme exposé à des contaminants chimiques est un changement d'allocation d'énergie (Rowe, 2003). De ce fait, les coûts de maintenance associés à la protection contre le stress chimique entraînerait une réduction des ressources énergétiques allouées à la croissance entraînant une baisse générale de la condition des juvéniles.

Il a longtemps été suggéré que les biomarqueurs biochimiques devraient être utilisés en conjugaison avec des mesures de fitness (Depledge et al., 1995). Cependant, peu d'étude ont démontré des relations corrélatives entre réponses de biomarqueurs biochimiques et des réductions de fitness d'un organisme aquatique exposés à un polluant (Depledge et al., 1995; Lesser et al., 2001; Fonseca et al., 2009). C'est ainsi que dans le cadre du programme DIESE, nous avons proposé de développer une

approche multibiomarqueurs pour améliorer la capacité à utiliser les réponses des biomarqueurs à prédire des conséquences écologiques d'exposition aux contaminants chimiques. Cette approche a été réalisée par des expérimentations au laboratoire et sur le terrain avec des juvéniles de poisson exposés à des concentrations environnementales de contaminants chimiques observées pendant une pollution accidentelle ou chronique.

Le premier objectif de ce travail était d'analyser la capacité d'indices de croissance et de condition à refléter les dommages induit par les contaminants chimiques sur l'état de santé des juvéniles de poissons, représentant un stade de vie critique pour le renouvellement des populations (Gibson, 2005; Selleslagh et al., 2009, Beck et al., 2001), et donc leur potentialité en tant que biomarqueurs en écotoxicologie. Le second objectif était d'étudier la pertinence écologique de biomarqueurs biochimiques par analyses de leurs relations avec les paramètres reflétant l'état de santé du poisson. Le dernier objectif était de comparer les réponses observées sur le terrain et au laboratoire. Des expérimentations au laboratoire ont été réalisées dans un contexte de pollution aigue en exposant des juvéniles de bar (*Dicentrarchus labrax*) à du pétrole et ensuite dans un contexte de pollution chronique en exposant des juvéniles de turbot (*Scophthalmus maximus*) à des sédiments portuaires et estuariens (Fig. 51). Des expériences de terrain ont été réalisées par mise en cage de juvéniles de bar et de turbot dans le même port que précédemment et par l'analyse de juvéniles de flet (*Platichthys flesus*) prélevés dans quatre estuaires européens plus ou moins impactés par les activités humaines (Fig. 52).

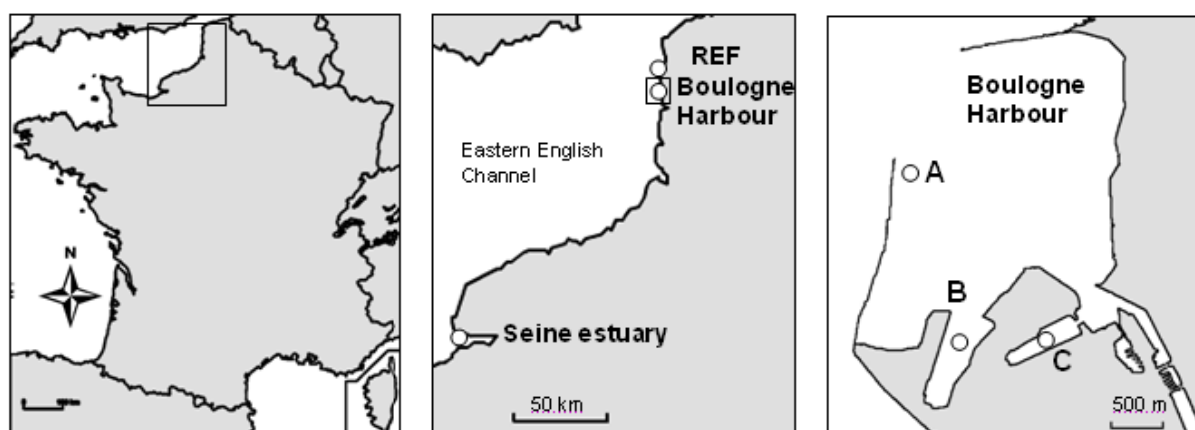


Figure 51 : Cartographie des trois sites de prélèvement de sédiments (Reference, Estuaire de Seine et Port de Boulogne sur Mer) et des trois stations au sein du port (A, B et C).

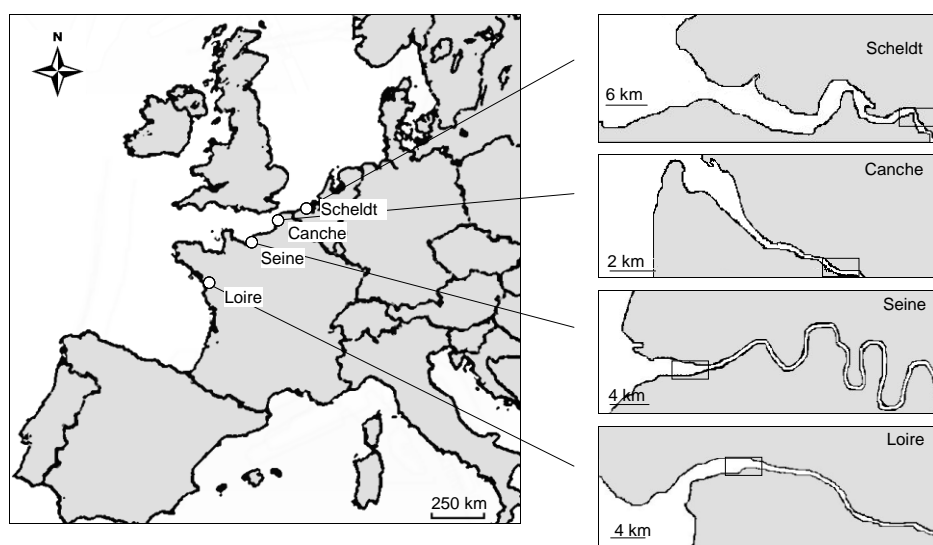


Figure 52 : Cartographie des 4 estuaires (Escaut, Canche, Seine et Loire) dans lesquels des juvéniles de flet ont été étudiés. Les rectangles présents dans les inserts représentent les aires d'échantillonnage.

L'étude de la bioaccumulation des contaminants dans les organes des poissons peut être utilisée en tant qu'indicateur d'exposition afin d'évaluer la disponibilité des contaminants. Cependant les résultats ont montrés que cela n'est pas vrai pour les HAP qui sont rapidement métabolisés (Budzinski et al. 2004) et ce, d'après nos données, même par les juvéniles. Le dosage des HAPs dans les poissons ne serait pas une méthode pertinente pour déterminer le niveaux d'exposition des poissons suite à une contamination pétrolière (Collier et al., 1996). A l'inverse le dosage de métaux semble refléter les niveaux d'exposition des juvéniles.

Plusieurs études ont montré que le pétrole et ses composés pouvaient inhiber la croissance d'un certain nombre d'espèces de poisson (Al-Yakoob et al., 1996 ; Moles and Norcross, 1998 ; Saborido-Rey et al., 2007). Les effets à long de terme de ce genre d'exposition à courte durée restent peu connus, c'est pourquoi dans notre étude, nous avons appliqué une période en eau claire après l'exposition. Une baisse significative de plusieurs biomarqueurs physiologiques a été observée 28 et 26 jours après les deux temps d'exposition. Une diminution du taux de croissance en poids et du rapport ARN/ADN ont été observées après les 48 h d'exposition (Fig. 53). Ces deux paramètres apparaissent ainsi sensibles à une exposition au pétrole. L'indice de condition de Fulton s'est révélé moins sensible puisqu'il ne diminue qu'après les 96 h d'exposition et l'indice lipidique ne montre pas de variation. Cette étude montre ainsi que les indices de croissance et de condition permettraient de renseigner sur l'état de santé des poissons survivant après une marée noire.

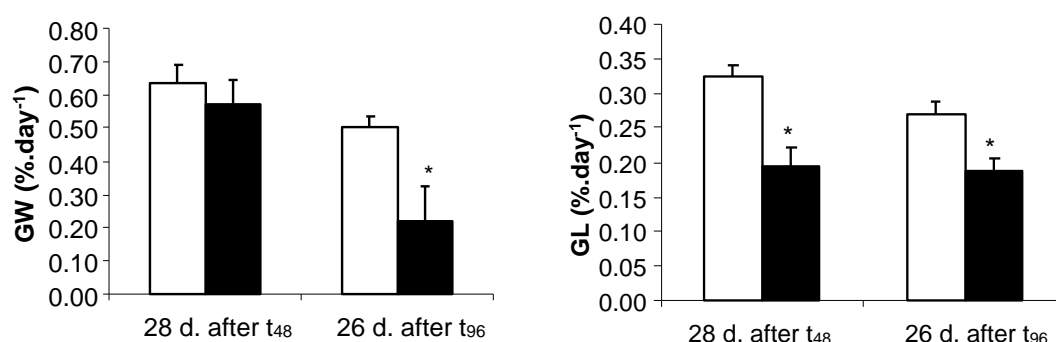


Fig. 53 : Taux de croissance spécifique de la taille (GL) et du poids (GW) (moyenne  $\pm$  SE) chez des bars non exposés (histogrammes blancs) et exposés aux hydrocarbures (histogrammes noirs) pendant 48 h et 96 h suivis de 28 et 26 jours en eau claire.

Dans une seconde étude au laboratoire, des turbots ont été exposés à des sédiments portuaires et estuariens. Une diminution graduelle des taux de croissance en poids a été observée avec des niveaux croissants de contaminants chimiques dans les sédiments. Une diminution du rapport ARN/ADN a également été observée dans les poissons des quatre conditions contaminées par rapport à la référence, ce qui confirme la diminution de croissance et des réserves énergétiques (Fig. 54). Cet indice biochimique a été considéré comme un indice fiable de l'état nutritionnel et de la croissance de larves et juvéniles de poisson, et a été souvent utilisé dans des études écologiques (Clemmesen, 1988; Buckley et al., 1999). Les indices de condition de Fulton et les rapports TAG:ST étaient également corrélés avec les taux de croissance. Cette diminution de l'indice lipidique dans les turbots exposés aux quatre sédiments contaminés témoigne des réserves énergétiques amoindries. La déplétion lipidique a été reconnue comme une réponse générale au stress (Claireaux et al., 2004). La détoxification et la régulation des xénobiotiques impliquent des mécanismes à la fois passifs et actifs et nécessitent ainsi de l'énergie (Alquezar et al., 2006), au détriment des processus de croissance.

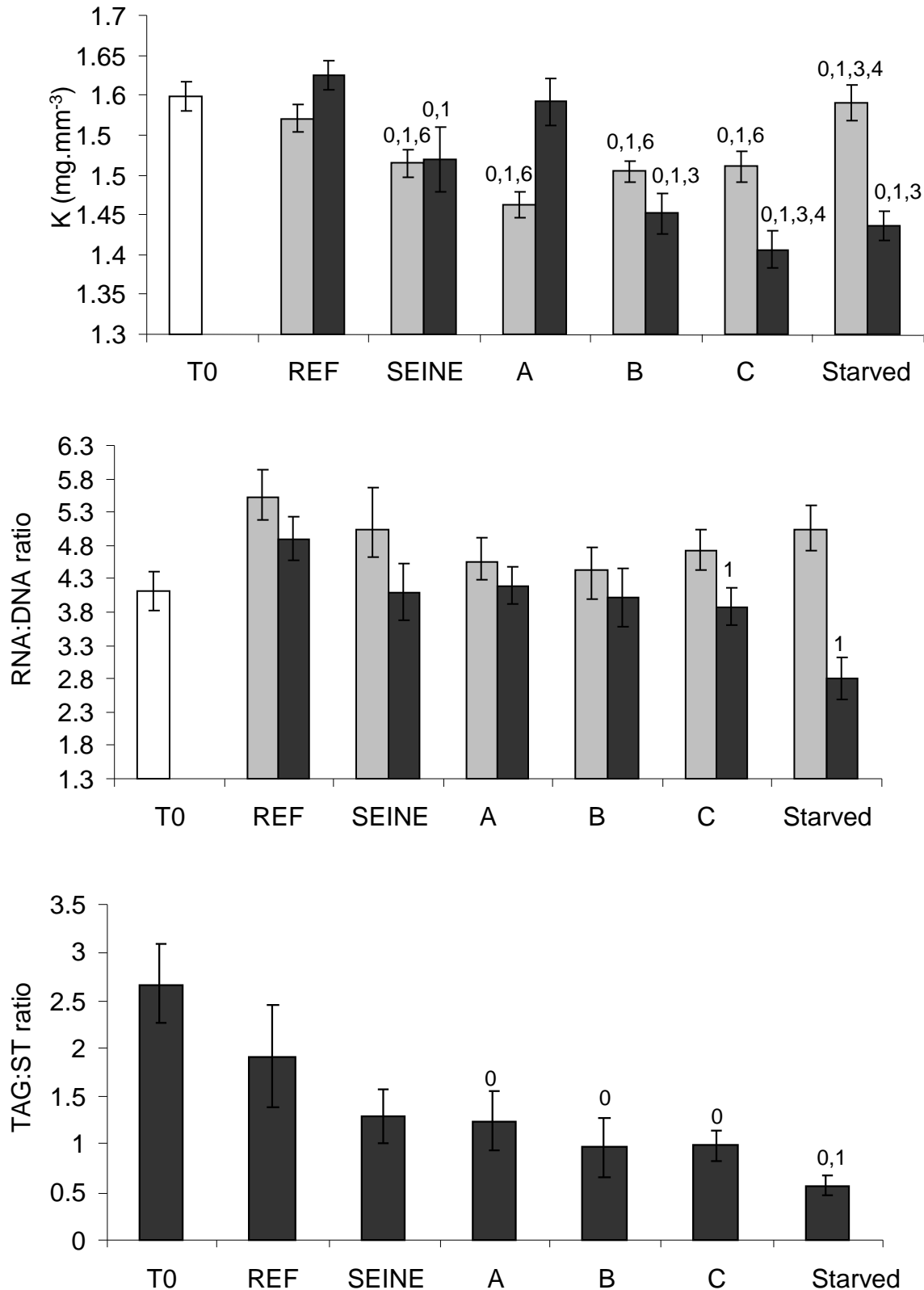


Figure 54 : Indice de condition de Fulton (K), du rapport ARN:ADN et de l'indice lipidique (ratio TAG:ST) de turbot exposés à cinq sédiments (Référence, Seine, A, B and C ; voir cartographie Fig 51 et 52) pendant 7 (■) et 21 (■) jours (moyenne  $\pm$  SE). n=15. (0), (1), (2), (3), (4), (5), (6) indiquent des différences significatives ( $p < 0.05$ ) en comparaison du "t<sub>0</sub>", Seine, A, B, C et poisson non alimenté (starved), respectivement.

Pour extrapoler les précédents résultats obtenus en conditions de laboratoire sur la potentialité des indices de croissance et de condition en tant que biomarqueurs, des expériences de terrain ont été réalisées pour analyser le rôle des facteurs biotiques et abiotiques sur leurs réponses. Dans une première étape, des juvéniles de bar et de turbot ont été mis en cage dans le port de Boulogne sur Mer. Les performances physiologiques des bars montrent de plus fort taux de croissance, de rapport ARN/ADN et d'indice de condition de Fulton dans la station la moins contaminée par comparaison à la station B (Tab. 10). Le taux de croissance en poids et l'indice K des turbots mis en cage dans la station la moins contaminée étaient également plus forts. De la même façon, pour les deux espèces, l'indice de stockage lipidique (TAG/ST) étaient significativement plus fort dans la station A par rapport à la station B.

Table 10 : Taux de croissance en longueur (GL) et en masse (GW), de l'indice de Fulton (K), du ratio ARN/ADN et du ratio TAG/ST (moyenne  $\pm$  SD) chez les juvéniles de bar et de turbot encagés dans les stations A and B ( $t_0$ : référence). Pour chaque espèce, <sup>(1)</sup> and <sup>(2)</sup> indiquent les différences significatives observées ( $p < 0.05$ ) par comparaison avec le " $t_0$ " et la station A respectivement.

Biological parameters	Sea bass		Turbot	
	A	B	A	B
GL	$0.46 \pm 0.13$	$0.10 \pm 0.26^2$	$0.04 \pm 0.07$	$0.03 \pm 0.09$
GW	$1.50 \pm 0.29$	$-0.21 \pm 0.34^2$	$-0.19 \pm 0.23$	$-0.39 \pm 0.23^2$
K	$1.03 \pm 0.10$	$0.85 \pm 0.11^{1,2}$	$1.41 \pm 0.15^1$	$1.32 \pm 0.06^{1,2}$
RNA:DNA	$3.29 \pm 1.11$	$1.71 \pm 0.57^{1,2}$	$3.39 \pm 1.29^1$	$3.26 \pm 1.60^1$
TAG:ST	$0.73 \pm 0.60$	$0.22 \pm 0.13^{1,2}$	$0.45 \pm 0.35^1$	$0.19 \pm 0.14^{1,2}$

Ces résultats de croissance et de condition des poissons mis en cage dans le port peuvent être comparés avec ceux de notre étude précédente dans laquelle les turbots ont été exposés aux sédiments des mêmes stations. La croissance en longueur et en poids mesuré sur les turbots exposés au sédiment B étaient similaires à ceux des individus mis en cage dans cette même station. Cependant les indices de condition (indice K, rapports ARN/ADN, TAG/ST) étaient plus faibles dans les poissons encagés. Ces résultats comparatifs suggèrent que des facteurs additionnels autres que les contaminants associés aux sédiments peuvent avoir influencé la condition des poissons. En particulier, dans l'étude au laboratoire, un changement d'eau quotidien a été réalisé, ce qui a pu limiter le transfert des contaminants via la colonne d'eau. De plus, les poissons ont été nourris avec des granulés non contaminés, alors qu'il est fort probable que dans l'environnement naturel, la nourriture représente également une source de contamination.

La sensibilité de l'indice de condition K de Fulton et de l'indice lipidique a été confirmée dans l'étude de terrain sur les juvéniles de flet. Sur la base de l'indice de condition de Fulton, les poissons de l'estuaire de la Canche ont été trouvés en meilleure santé que ceux de l'Escaut, la Seine et la Loire. Ces valeurs de K des poissons de la Canche s'avèrent augmenter avec la taille des poissons et donc avec le temps passé dans l'estuaire (Fig. 55). Cette augmentation des valeurs de K avec la taille étaient moins évidentes pour les trois autres estuaires, ce qui montre que les flets n'améliorent pas leur condition avec le temps passé dans l'environnement anthropisé. La diminution de l'état de santé des poissons dans les estuaires contaminés a été confirmée par l'analyse de teneur en lipides dans le muscle des flets. Etant donné que le fractionnement lipidique est en général plus représentatif des réserves lipidiques que la teneur globale (Norton et al., 2001), le rapport TAG/ST a également été calculé. Les résultats confirment les faibles réserves lipidiques disponibles dans les flets des trois estuaires anthropisés par rapport à ceux de la Canche.



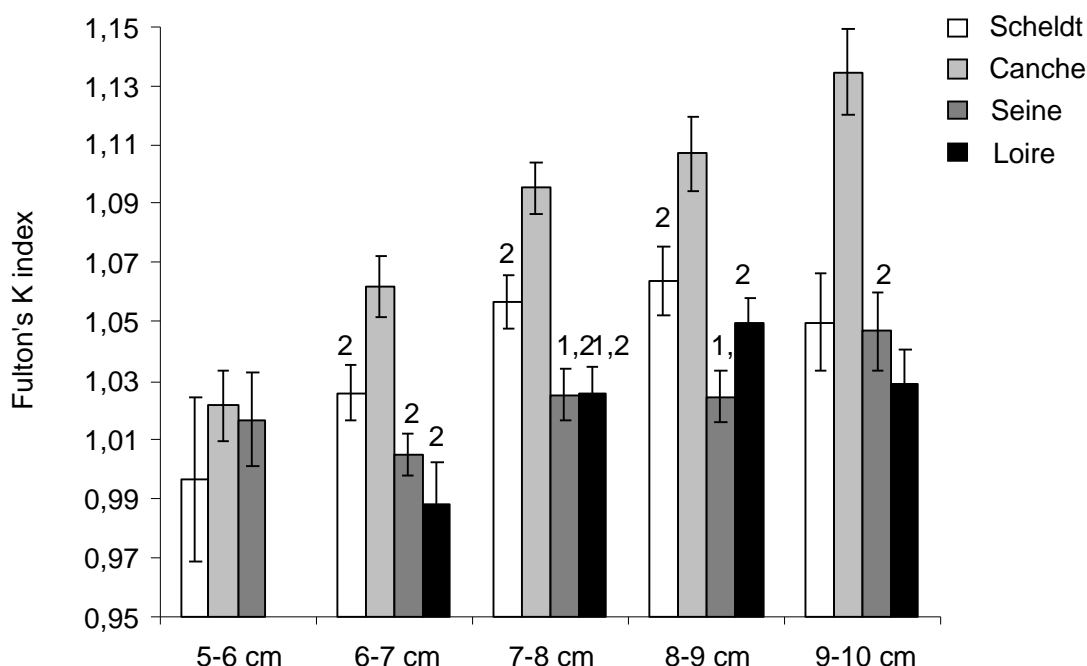


Figure 55 : Indice de condition de Fulton (K) pour cinq groupes de taille de flets échantillonnés dans quatre estuaires. n=30. (1), (2), (3), (4) indiquent des différences significatives ( $p < 0.05$ ) en comparaison de l'Escaut, de la Canche, de la Seine et de la Loire respectivement.

Dans la nature, les poissons sont sujets à d'autres stressseurs (naturels ou anthropiques) qui peuvent conduire à des effets additionnels à ceux induit par les contaminants chimiques. C'est en particulier le cas dans les aires estuariennes qui sont utilisées par la majorité des juvéniles de poissons marins. Parmi ces stress, la disponibilité et la qualité de la nourriture jouent un rôle majeur dans la détermination de la croissance d'un individu et donc la taille de sa population (Gibson, 1994). Une diminution de la disponibilité en nourriture combinée avec les effets induit par les polluants pourraient être critiques pour les juvéniles de poissons, leur capacité à maintenir un état énergétique basal en étant amoindrie (Driedger et al., 2009). C'est pourquoi, dans une dernière étude, nous avons analysé la capacité de juvéniles de turbot affaiblis par une contamination chimique à tolérer des conditions limitées en nourriture.

Après 35 jours en eau claire, les résultats montrent que même si les taux de croissance et les rapports TAG/ST ont drastiquement diminués durant l'exposition aux sédiments contaminés, ils retrouvent des valeurs similaires aux poissons de référence avec des conditions de nourriture optimales (Fig. 56). A l'inverse, avec des conditions de nourriture limitées, les rapports TAG/ST restent significativement plus faibles dans les poissons exposés aux contaminants par rapport à la référence. Les résultats d'analyses en métaux montrent une bioaccumulation en Cd, Cu et Pb pendant les 26 jours d'exposition. Cette bioaccumulation n'est plus observée après les 35 jours si les poissons sont nourris tous les jours mais persiste en conditions limitées en nourriture. Ces résultats suggèrent que des poissons affaiblis par une contamination chimique seraient capables de retrouver de bonnes

performances physiologiques sous un environnement propre mais serait davantage affecté par un stress nutritionnel comme imposé pendant l'hiver.

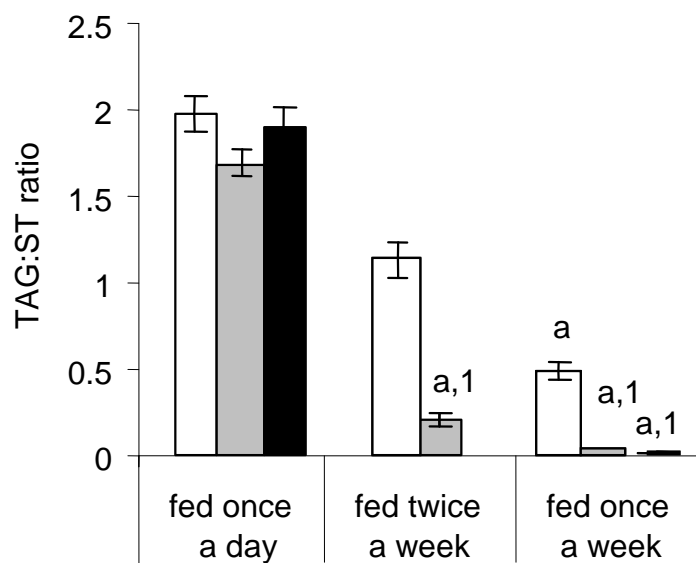


Figure 56. Ratio triacylglycérol/ stérols (TAG:ST) de turbot exposés pendant 26 jours à trois sédiments: Ref (□), B (▒) et C (■) (voir cartographie Fig 52) suivis de 35 jours en eau Claire pendant laquelle les bars ont été alimentés une, deux ou trois fois par semaine. <sup>(1)</sup> indique des différences significatives ( $p < 0.05$ ) en comparaison de la référence du même au même temps et <sup>(a)</sup> en comparaison des poissons alimentés une fois par semaine pour le même traitement.

Dans toutes nos études, excepté celle sur les flets, les réponses de deux paramètres impliqués dans la biotransformation, l'EROD et la GST, et une enzyme antioxydante, la catalase, ont été utilisés en tant que biomarqueur précoce de toxicité. Les relations entre ces biomarqueurs biochimiques et ceux physiologiques à travers les différentes expérimentations sont montrées dans le Tableau 11.

Après exposition des juvéniles de bar à du pétrole, une augmentation des activités EROD a été observée dès 48 h d'exposition (Tab. 12). Ces activités ont ensuite doublé après les 96 heures d'exposition, ce qui suggère un degré d'exposition plus important des bars au pétrole par rapport au 48 h. Une augmentation des activités GST est également observée sur les bars en présence du pétrole mais uniquement après les 96 h d'exposition. L'exposition de 48 h ne semble donc pas avoir été suffisante pour induire cette enzyme. Aucune différence d'activités catalase n'a été observée entre les bars exposés au pétrole et le groupe contrôle.

L'augmentation des activités EROD apparaît reliée aux effets sur l'état de santé des poissons. En effet, cette augmentation après 48 h était associée à des effets sur la croissance des bars. L'augmentation plus importante après les 96 h correspond également à des effets plus marqués sur l'état de santé des poissons suite à l'exposition au pétrole.

Tableau 11 : Synthèse des réponses des biomarqueurs utilisés dans les cinq études 1) exposition des bars aux hydrocarbures 2) bars et turbots mis en cage dans le port de Boulogne 3) turbot exposés à des sédiments contaminés 4) flets échantillonnés dans les estuaires et 5) turbot transférés dans de l'eau non contaminée après une exposition aux sédiments. Une flèche vers le haut indique une augmentation significative de plus d'une fois (↑), deux fois (↑↑) et trois fois (↑↑↑) la valeur de référence. De façon similaire, une flèche vers le bas (↓) indique une diminution significative en comparaison à la valeur de référence.

Exp.	Species	Contaminants	Method	Site	Time (days)	EROD	GST	CAT	GW	GL	K	ARN:ADN	TAG:ST
1	Seabass	Petroleum	labo		2 4	↑↑ ↑↑↑	- ↑↑	- -	- ↓↓	↓ ↓	- ↓	↓ ↓	- -
2	Seabass Turbot	Harbour	caging	Port B	38	↑↑ ↑↑	↑↑ ↑	↓↓ -	↓↓↓ ↓↓	↓↓↓ -	↓ ↓	↓↓ -	↓↓↓ ↓↓
3	Turbot	Sediment	labo	Port A	7 21	↑ -	- -	↑↑ -	↓↓ ↓	↓↓ ↓↓	↓ -	- -	↓↓ ↓↓
				Port B	7 21	↑↑ -	- ↑	↑↑↑ ↑↑	↓↓ ↓	↓↓ ↓↓↓	↓ ↓	- -	↓↓ ↓↓
				Port C	7 21	- ↑	- ↓	↑ -	↓↓↓ ↓↓	↓↓↓ ↓↓↓	↓ ↓	- ↓	↓↓ ↓↓
				Seine	7 21	↑ ↑	- -	↑ -	↓↓ ↓	↓↓ ↓↓	↓ ↓	- -	- -
				Seine							↓		↓↓↓
				Escaut							↓		↓↓↓
4	Flounder	Estuaries	<i>in situ</i>	Loire							↓		↓↓↓
		Sediment		Port B Port C	26				↓↓↓ ↓↓↓	↓↓ ↓↓	↓ ↓	- -	↓↓ ↓↓
5	Turbot	Fed once a day	labo	Port B Port C	61				- -	- -	- -	- -	- -
		Fed once a week		Port B Port C					- -	- -	- -	- -	↓↓↓ ↓↓↓

Tableau 12 : Activité éthoxyrésorufine-O-dééthylase (EROD,  $\text{pmol.min}^{-1}.\text{mg prot}^{-1}$ ), glutathion S-transférase (GST,  $\mu\text{mol.min}^{-1}.\text{mg prot}^{-1}$ ) et catalase (CAT,  $\mu\text{mol.min}^{-1}.\text{mg prot}^{-1}$ ) chez des bars non exposés (CTRL) et exposés à des hydrocarbures (OIL) pendant 48 h et 96 h. (\*) indique une différence significative ( $p < 0.05$ ) en comparaison avec le control.

	T = 48 h		T = 96 h	
	CTRL	OIL	CTRL	OIL
EROD	$0.01 \pm 0.01$	$2.74 \pm 0.14^*$	$0.02 \pm 0.01$	$6.84 \pm 0.26^*$
GST	$0.29 \pm 0.03$	$0.31 \pm 0.02$	$0.26 \pm 0.02$	$0.67 \pm 0.02^*$
CAT	$1.31 \pm 0.06$	$1.45 \pm 0.10$	$1.51 \pm 0.10$	$1.57 \pm 0.10$

a.

Dans les mélanges chimiquement complexes, comme celles trouvées dans les sédiments portuaires, les régulations des biomarqueurs sont potentiellement sujettes aux effets additifs, synergiques ou antagonistes des interactions chimiques. Les activités EROD et GST montrent des valeurs plus importantes dans les bars et turbots, encagés dans la station interne du port, par rapport à celle situé à l'entrée. Cette augmentation peut être reliée aux concentrations en HAPs plus fortes dans le sédiment de la station B par rapport à la A. Une diminution des activités catalase a été observée chez les deux espèces, même si celle des turbots n'apparaît pas significative. Les taux élevés de l'EROD et de la GST étaient significativement corrélés aux réductions de la croissance somatique, des rapports ARN/ADN et TAG/ST des bars mis en cage dans la station contaminée (Tab. 13). Cette relation témoigne des coûts métaboliques associés à la synthèse et/ou l'expression des enzymes de détoxification (Rose et al., 2006). Les faibles activités catalase mesurées sur le bar était également associée à une diminution des biomarqueurs physiologiques. En effet, les activités catalase montrent de fortes corrélations avec l'ensemble des indices de croissance et de condition mesurés. De plus faibles corrélations ont été observées pour le turbot.

Tableau 13 : Coefficient de corrélation de Pearson entre les réponses des biomarqueurs (EROD, GST, CAT) et les paramètres biologiques (taux de croissance en longueur (GL) et en masse (GW), de l'indice de Fulton (K), du ratio ARN/ADN et du ratio TAG/ST mesurés chez les juvéniles de bar (a) et de turbot (b) mis en cage dans les stations A et B. Les corrélations sont significatives pour  $p^* < 0.05$ ,  $p^{**} < 0.01$  et  $p^{***} < 0.001$ .

	GW	GL	K	R:D	TAG:ST	EROD	GST
EROD	-0.41*	-0.49*	-0.22	-0.43*	-0.45*	-	
GST	-0.57**	-0.56***	-0.53**	-0.48*	-0.37	0.40*	-
CAT	0.74***	0.70***	0.60***	0.47*	0.63***	-0.30	-0.59***

a.

	GW	GL	K	R/D	TAG:ST	EROD	GST
EROD	-0.45	-0.04	-0.46*	0.04	-0.47*	-	
GST	-0.06	0.15	-0.14	0.19	-0.24	0.27	-
CAT	0.01	-0.20	0.33	0.08	0.62**	-0.50*	-0.25

b.

De la même façon que pour l'expérience d'encagement, des différences significatives des activités EROD, GST, CAT ont été observées sur les turbots exposés aux quatre sédiments contaminés par rapport à la référence. Cependant, de plus fortes réponses ont été observées dans les poissons exposés au sédiment B alors que le sédiment C présente les plus fortes concentrations en contaminants chimiques. Alors que l'EROD et la CAT montrent les plus fortes réponses à t7, de faibles relations ont été trouvées avec les biomarqueurs physiologiques des poissons. A t<sub>21</sub>, les activités EROD présentent des corrélations significatives et négatives avec les rapports ARN/ADN, la catalase avec les taux de croissance et l'indice K de Fulton. Cependant, cette relation reste relativement faible puisque le coefficient de corrélation est d'environ 30%. La principale différence entre biomarqueurs biochimiques et physiologiques était dans les réponses des turbots exposés au sédiment C. En effet, les biomarqueurs biochimiques présentent de faibles réponses après exposition au sédiment C alors que de fortes différences sont observées après exposition au sédiment B (Fig. 57). Les sédiments B et C présentent différents niveaux de contamination suivant les métaux considérés. Ceci supporte l'hypothèse précédente de potentiels effets antagonistes des différents contaminants sur les réponses des biomarqueurs biochimiques. L'analyse des relations entre biomarqueurs biochimiques et physiologiques suggère que, en se basant seulement sur les réponses biochimiques, les effets délétères du sédiment C seraient sous-estimés.

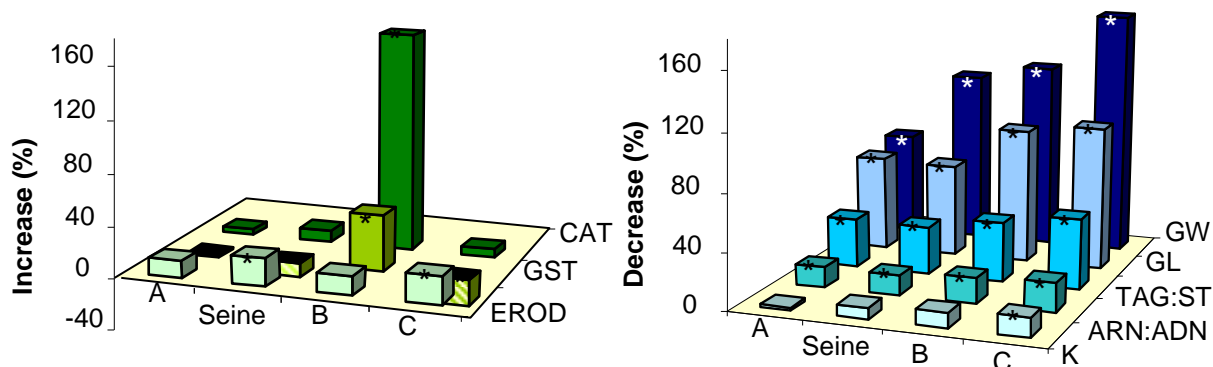


Figure 57 : Variations des marqueurs biochimiques (A) et physiologiques (B) chez les turbots exposés aux sédiments A, B, C, et de la Seine en comparaison avec les sédiments de référence (REF). \* <math>p < 0.05</math>

Des outils écotoxicologiques applicables à la prédiction des effets des contaminants chimiques ont été développés dans cette approche expérimentale. Ces résultats confirment les relations complexes de cause à effet entre exposition aux polluants, métabolisme et dommages sur la santé des organismes. Alors que les réponses des biomarqueurs biochimiques apparaissent reliées à celles des biomarqueurs physiologiques après une pollution accidentelle avec un seul type de polluant, cette relation est moins évidente en pollution chronique avec une mixture de composés. Cette inconsistance des réponses biochimiques mesurées dans ce travail suggèrent que les variations des biomarqueurs biochimiques peuvent être difficiles à interpréter dans une situation naturelle. Cette étude recommande ainsi que ces biomarqueurs ne soient pas utilisés seuls dans les programmes de biosurveillance puisque les interactions entre les différents composés chimiques peuvent entraîner une sous-estimation des effets biologiques. En effet, les organismes sont exposés à des mixtures de contaminants qui peuvent induire des effets synergiques ou antagonistes sur leurs réponses. Les réponses des biomarqueurs physiologiques apparaissent plus prédictives des effets délétères des contaminants chimiques. L'utilisation de biomarqueurs à forte pertinence écologique apparaît ainsi essentielle pour évaluer les effets des contaminants chimiques sur la santé des organismes et *a fortiori* des populations.

Au travers des études de terrain et de laboratoire, les paramètres de croissance, l'indice de condition K de Fulton, le rapport ARN/ADN et l'indice lipidique (TAG/ST) ont été utilisés avec succès pour évaluer les effets des contaminants chimiques sur les juvéniles de poisson. Ils informent indirectement sur les coûts énergétiques induits par les contaminants chimiques et directement sur la croissance et l'état de santé de l'individu exposé (Adams et al., 1990). Ils peuvent ainsi refléter les probabilités de survie de l'organisme. Ces indices biologiques présentent l'avantage d'être relativement facile à mesurer et offrent des informations pertinentes sur l'état de santé du poisson. C'est pourquoi cette étude suggère que ces indices devraient être utilisés dans les études écotoxicologiques en faisant l'hypothèse que des réductions dans la croissance et le statut énergétique d'un poisson face aux contaminants chimiques pourraient dramatiquement diminuer leur chance de survie dans les aires de nourriceries. Néanmoins, l'inhérente variabilité des réponses des biomarqueurs physiologiques et leur sensibilité aux facteurs biotiques et abiotiques doivent être prises en compte pour éviter une confusion dans l'étude de leurs réponses. C'est pourquoi, des études à la fois sur le terrain et au laboratoire devraient être entreprises pour estimer la qualité d'un site donné. En particulier, l'expérience de mise en cage représente un bon compromis car avec cette technique, nous avons été capables d'intégrer des conditions réelles d'exposition aux polluants. De plus, cette étude démontre la potentialité de l'utilisation des juvéniles de poisson dans les études écotoxicologiques car leurs performances physiologiques sont plus élevées que celles des plus organismes plus âgés, probablement du fait de leur différence d'état métabolique.

En conclusion, les marqueurs physiologiques utilisés s'avèrent être des indicateurs intéressants pour la mesure de la condition des poissons. Les marqueurs biochimiques sont quant à eux peu corrélés à ces indices physiologiques montrant que quelques biomarqueurs ne suffisent pas à porter un bon diagnostic mais qu'il convient de choisir ou d'appliquer un ensemble de mesures pertinents dans un cas d'étude donné. Il est à noter que les mesures chimiques telles que la mesure d'hydrocarbures ne permettent pas non plus d'apporter des informations pertinentes dans les cas étudiés car ils sont rapidement métabolisés. Cela pose le problème du choix de la bonne référence contaminée ou moins contaminée et de la mesure qui permet objectivement d'en juger. De même, les indices physiologiques apportent une information qui ne permet pas forcément de préjuger de la survie ou de la reproduction des organismes qui peuvent s'adapter différemment à des environnements supposés perturbés. Ainsi, l'utilisation d'une gamme relativement large d'indices biologiques intégrant différents niveaux d'organisation biologique semble l'approche la plus pertinente pour une étude généraliste de l'état de santé des organismes (qui ne s'oppose pas à une démarche mécanistique concernant des problèmes spécifiques).

#### IV.5. Développement d'un indice multi-biomarqueurs

La difficulté à appréhender les nombreuses données disponibles suite au déploiement d'une approche multi-biomarqueurs est un argument mis en avant pour justifier la difficile utilisation de ces outils dans un contexte réglementaire. Afin de combler cette lacune, plusieurs auteurs ont proposé des méthodes d'agrégation des résultats permettant de simplifier le rendu des données voire d'associer à la réponse mesurée des consignes de gestion.

Dans le cadre de cette action, le travail a consisté à développer puis à éprouver un outil de synthèse des résultats multi-biomarqueurs. Préalablement à ce travail et en se basant sur une analyse des outils existants, plusieurs critères de développement ont été définis :

- Le rendu des résultats doit associer une valeur numérique permettant de quantifier le niveau d'impact, et une représentation graphique permettant de considérer la spécificité des réponses.

- Le traitement des données doit s'appuyer sur la notion d'écart à la référence. Cette notion, introduite dans le cadre de la détermination de l'état écologique des masses d'eau dans la directive européenne cadre sur l'eau, contribuera à l'adéquation entre cet outil et les politiques de suivi de la qualité des milieux.

- L'outil développé doit être évolutif afin de pouvoir facilement intégrer de nouveaux indicateurs et/ou permettre son transfert chez d'autres espèces.

Ce travail a été réalisé chez l'épinoche à trois épines (*Gasterosteus aculeatus* L.), espèce modèle en écotoxicologie dont le potentiel pour une application en biosurveillance des milieux aquatiques est désormais clairement établi (Sanchez et al., 2007, 2008a, 2010).

L'indice biomarqueur (IBI) développé s'est basé sur l'IBR (Integrated Biological Responses) développé par Beliaeff et Burgeot (2002) avec une modification de ce dernier permettant de prendre en considération les critères précédemment énoncés. Au préalable, les données doivent présenter une distribution normale ou s'en approcher. Ainsi, dans une première étape, les données sont log-transformées selon la relation suivante :

$$Y_i = \log\left(\frac{X_i}{\overline{X_0}}\right)$$

où  $X_i$  est la valeur mesurée pour un biomarqueur chez un individu prélevé sur un site donné et  $\overline{X_0}$  est la moyenne calculée pour un biomarqueur sur des données utilisées comme référence.

Sur les données log-transformées, il devient alors possible d'appliquer les règles mathématiques qui régissent la loi normale centrée réduite et donc de décrire la position de chaque échantillon par rapport à la moyenne générale de la population considérée en déterminant le paramètre  $Z_i$  pour chaque individu selon la relation suivante :

$$Z_i = \frac{Y_i - \mu}{\sigma}$$

Afin de créer une ligne de base de valeur 0 et de représenter la déviation des biomarqueurs mesurés sur un site par rapport à la déviation calculée pour les données de référence, un paramètre  $A_i$  est déterminé pour chaque biomarqueur sur un site donné selon l'équation suivante :

$$A_i = \overline{Z_i} - \overline{Z_0}$$

où  $\overline{Z_0}$  représente la moyenne des valeurs de  $Z_i$  calculée pour les valeurs de référence de chaque biomarqueur.

Les valeurs de  $A_i$  calculées pour les différents biomarqueurs sur un site donné sont alors reportées sur un graphique en étoile qui représente alors les variations, aussi bien positives que négatives, des différents biomarqueurs mesurés sur un site par rapport aux valeurs de référence normalisées (Fig. 58). Une valeur numérique d'indice « biomarqueurs » (IB), spécifique de chaque site

et qui représente la somme des effets observés sur le site considéré, est également calculée selon l'équation suivante :

$$IB = \sum |Ai|$$

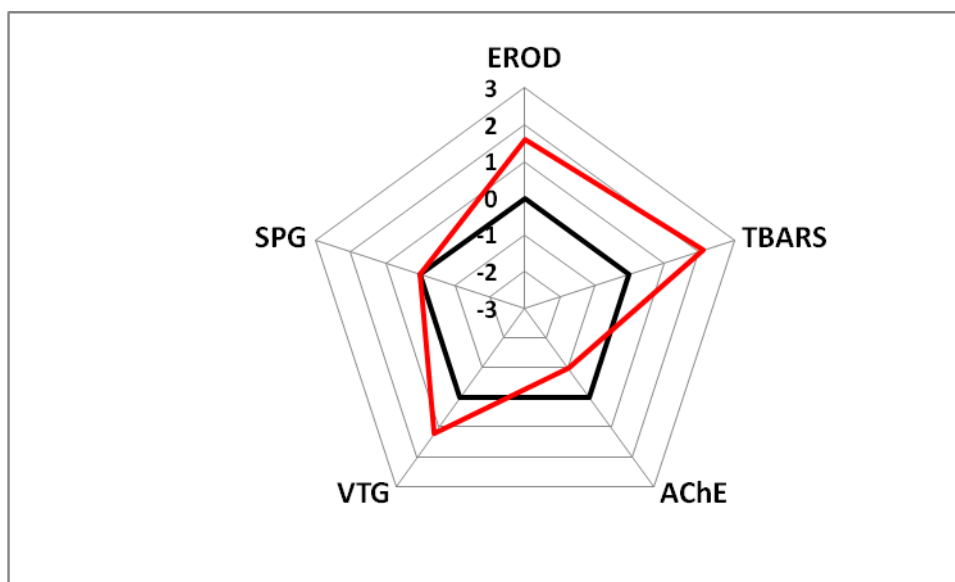


Figure 58 : Représentation graphique de l'indice biomarqueur. Le profil de réponse représenté est celui d'un site caractérisé par une induction de l'EROD, des TBARS et de la VTG mais aussi par une inhibition de l'AChE et une absence d'effet pour la SPG.

Cette méthodologie pose alors la question de la sélection de la ligne de base. Il s'agit d'un paramètre important dans le calcul de l'indice multi-biomarqueurs car directement lié au rendu des résultats et à leur interprétation. Ainsi, plusieurs stratégies peuvent être envisagées avec :

- L'utilisation d'une référence amont. Cette stratégie peut être utilisée pour des études de type amont/aval ou pour des suivis de cours d'eau.
- L'utilisation d'une référence historique. Cette stratégie, basée sur le cumul de données, est particulièrement indiquée pour le suivi d'un site.
- L'utilisation d'une référence dite « absolue » représentant la valeur physiologique du biomarqueur étudié dans une condition donnée. Cette stratégie semble être la plus adaptée à la mise en œuvre des biomarqueurs à une large échelle.

En première intention, les valeurs basales mesurées chez des épinoches échantillonnées sur le site faiblement anthropisé du Vallon du Vivier (Tancarville, Seine-Maritime, France) ont été retenues (Sanchez et al., 2008b). Afin d'évaluer la validité de cette référence sur une zone géographique étendue, une campagne d'échantillonnage a été mise en œuvre au niveau national. Elle a porté sur 8 sites sélectionnés pour leur appartenance au réseau de contrôle de surveillance de la DCE et pour la diversité de leurs pressions (Tab. 14). 3 des sites sélectionnés sont des sites de référence de la DCE. Cette étude a été complétée par l'étude de deux sites faiblement anthropisés ne faisant pas parti des réseaux décrits précédemment : le Vallon du Vivier et le Val des Fontaines à Tancarville (76).



Tableau 14 : Présentation des sites de l'étude et des résultats de l'échantillonnage. \* indique les sites du réseau de référence.

Site	Date	Effectif
Sorgue à Fontaine de Vaucluse (84)*	28/07/2009	20
Massane à Argelès sur Mer (66)	05/08/2009	13
Ruisseau des Assats à Genihat (63)	20/08/2009	20
Brioude à Gannat (03)	21/08/2009	20
Rhin à Hombourg (68)*	25/08/2009	20
Muehlbach à Landser (68)	25/08/2009	20
Evoissons à Bergicourt (80)*	10/09/2009	18
Lézarde à Epouville (76)	16/09/2009	20

Sur chacun des sites étudiés, 20 épinoches ont été échantillonnées pour la mesure d'un ensemble de biomarqueurs (Tab. 15). En parallèle, différents facteurs biotiques (longueur, masse, sexe, maturité sexuelle, parasitisme) et abiotiques (température de l'eau, conductivité, concentration en oxygène, espèces d'accompagnement, zone de Huet, rang de Strahler) ont été mesurés.

Brièvement, les résultats obtenus montrent que le statut reproducteur des poissons en lien avec la période d'échantillonnage sont des facteurs confondants majeurs dans l'interprétation des résultats. Il apparaît donc comme important, au sein d'une même zone géographique, de limiter l'étendue de la période de prélèvement ou, lors d'études à large échelle, de travailler sur des individus présentant un stade de reproduction similaire. Sous cette condition, la variabilité de la ligne de référence semble stabiliser et permet donc l'interprétation des résultats. Cette étude a également permis de mettre en lumière la difficulté que représente l'utilisation de sites de référence ou de sites faiblement anthropisés pour étudier les variations naturelles des biomarqueurs du fait de la multiplicité des mécanismes d'action des polluants qui sont évalués au travers d'une approche multi-biomarqueurs.

Tableau 15 : Biomarqueurs mesurés dans le cadre de l'étude de variabilité des valeurs basales. \* indique les biomarqueurs retenus pour le calcul de l'IBI.

Biomarqueur	Fonction	Susceptibilité
7-éthoxyrésorufine-O-dééthylase (EROD)*	Biotransformation	HAP, PCB-DL, dioxine
Cytochrome P4503A (CYP3A)	Biotransformation	Pesticides, médicaments
Glutathion-S-Transferase (GST)	Biotransformation	Pesticides, HAP
Glutathion Peroxydase (GPx)	Stress oxydant	Divers
Glutathion total (GSH)	Stress oxydant	Divers
Lipoperoxydation (TBARS)*	Stress oxydant	Divers
Acétylcholinestérase (AChE)*	Transmission nerveuse	Pesticides
Vitellogénine (VTG)*	Reproduction	Xéno-oestrogènes
Spiggin (SPG)*	Reproduction	Xéno-androgènes

Une alternative pour la définition de la ligne de base consiste en l'utilisation des données acquises sur un site amont. Cette adaptation qui n'est applicable que dans le cadre d'un suivi amont/aval permet de synthétiser les réponses multi-biomarqueurs sur un site d'intérêt (e.g. aval d'un rejet, ...).

En conclusion, ce travail a permis de développer une méthode de calcul permettant la normalisation des données biomarqueurs mais également leur agrégation dans un indice multi-biomarqueurs. Cet outil initialement développé chez l'épinoche peut désormais être appliqué à d'autres espèces mais également avec d'autres biomarqueurs.

#### IV.6. Cartographie des effets de la contamination chez les poissons sauvages

Dans le cadre de ce programme, une méthode d'échantillonnage spécifique a été développée. Celle-ci consiste à fournir des contenants avec du formol 4% aux personnels de l'ONEMA en charge du suivi des peuplements piscicoles. Ainsi, immédiatement après leur capture, des lots de 30 Cyprinidés (gardon, goujon, chevaine, vairon) sont sacrifiés, formolés puis rapatriés vers l'INERIS pour les analyses. Sur chaque individu, les gonades sont disséquées et préparées pour l'analyse de l'intersexe selon la méthode décrite par Batteman et al (2004). La rate, le rein, le foie et les branchies sont disséqués, enrobés en paraffine et conservés.

Ainsi, 16 sites ont été utilisés pour l'analyse de l'intersexualité. Les résultats obtenus montrent que sur 9 d'entre eux des poissons intersexués ont été observés avec une occurrence comprise entre 3 et 36 % (Fig. 59). Pour compléter cette analyse, l'indice de sévérité de l'intersexualité préalablement développé chez le flet a été mesuré. Cet indice qui correspond à une note sur 20, varie entre 0,3 et 7,1 montrant ainsi les différents niveaux de sévérité qui peuvent être rencontrés dans les cours d'eau français.

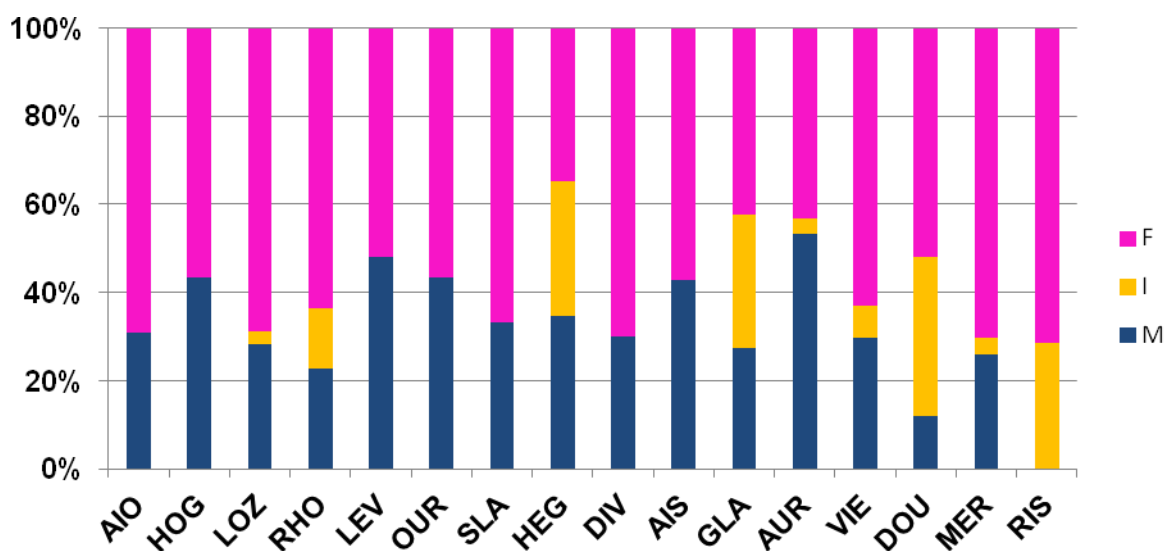


Figure 59 : Proportion relative de sexes identifiés, dont les poissons intersexués (I), dans les échantillons de différents cours d'eau de la zone INTERREG.

Lors de programmes précédents et dans DIESE, des échantillonnages réguliers, mais parfois discontinus pour certains sites, ont été réalisés. L'étude histologique des gonades de gardons mâles permet d'établir une carte des gardons intersexués dans les régions étudiées (Fig. 60). Plusieurs enseignements peuvent être retirés de ces résultats. Les incidences les plus fortes se situent en pays de Bray, une région agricole avec peu d'industries et une population modérée, laissant suspecter un impact fort de rejets d'origine agricole. La région Nord est, au contraire, peu concernée par la présence de poissons intersexués malgré l'étude de sites particulièrement touchés par des pollutions métalliques (en particulier). La Seine et la Somme abritent des populations de gardons modérément à faiblement touchés par les perturbations conduisant à l'intersexualité (le site de Triel sur Seine où un quart des poissons est intersexué repose sur un échantillonnage faible et doit être pris avec précaution).

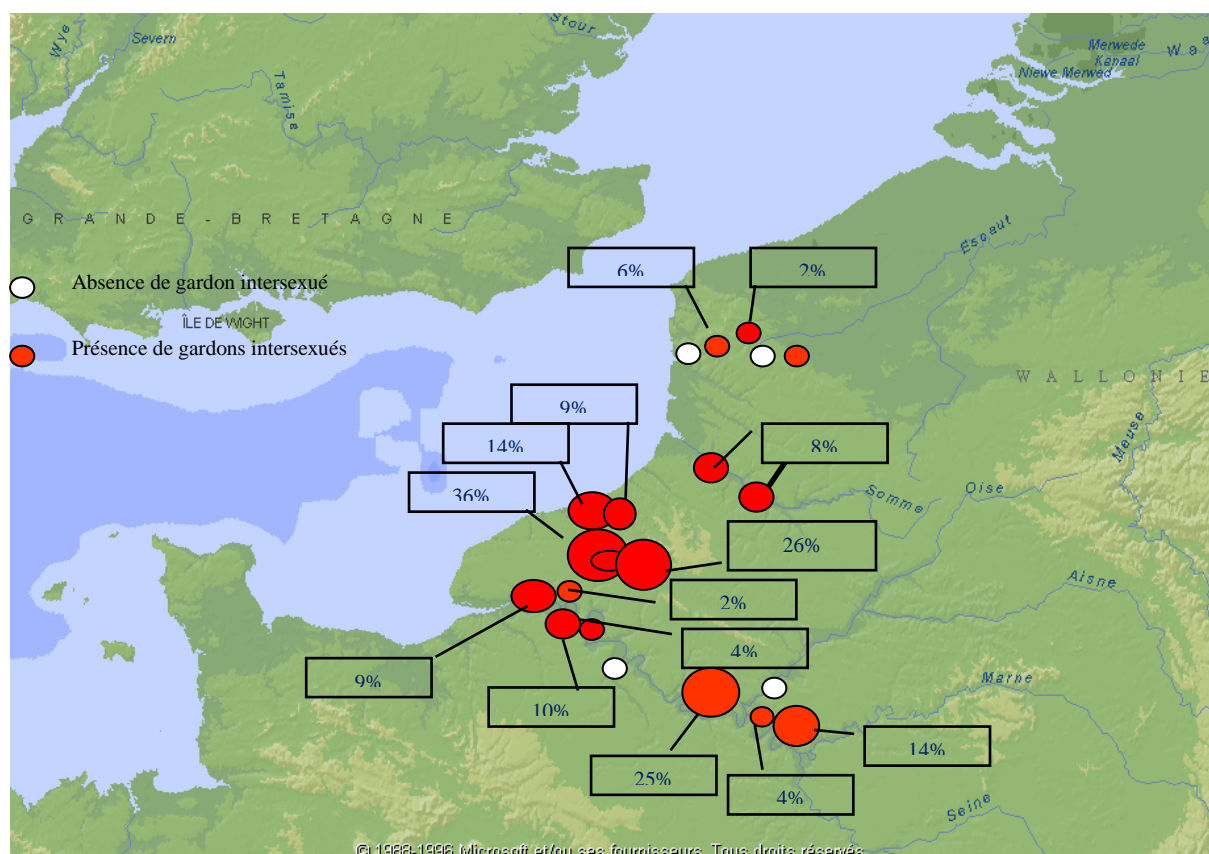


Figure 60 : Cartographie de l'incidence de gardons intersexués (2000-2010)

En conclusion, la mesure de l'occurrence et de la sévérité de l'intersexualité chez les poissons des cours d'eau de la zone d'étude montre que ces poissons sont soumis très probablement exposés à des polluants perturbateurs endocriniens dans des proportions différentes selon les sites. De plus, ce travail confirme la possibilité de mesurer en milieu continental un indicateur biologique reflétant l'état de santé des organismes en lien avec leur exposition à des xénobiotiques perturbateurs endocriniens, un marqueur qui est d'ailleurs déjà utilisé en milieu marin.

#### IV.7. Cartographie de l'activité anti-androgénique (AA) en zones côtières et estuariennes

Un grand nombre de sites ont été échantillonnés par les partenaires DIESE la période 2009-2012 (y compris les estuaires principaux et les régions côtières, Fig. 60). Dans certains estuaires plusieurs sites ont été échantillonnés afin que l'enquête globale comprenne un total supérieur à 100 sites en France et au Royaume-Uni. Les sédiments ont été prélevés à 2-3 cm de profondeur, et chaque échantillon était composé de 20 sous-échantillons prélevés dans une zone de 3 m<sup>2</sup>. En même temps

que la collecte des sédiments, jusqu'à 30 palourdes ont été échantillonnées dans chaque site pour déterminer l'incidence de l'intersexualité et les niveaux d'activité AA dans les tissus.

Une étude approfondie a été menée dans l'estuaire Southampton car les premiers résultats montraient des niveaux élevés d'activité AA. Ainsi 5 sites supplémentaires au sein de l'estuaire ont été prélevés et ont confirmé les niveaux élevés d'activité AA dans cet estuaire. Ces échantillons comprenaient 3 sous-échantillons prélevés dans une zone de 3 m<sup>2</sup>. Les sédiments ont été tamisés pour déterminer le pourcentage d'argile, de limon et de sable. Le carbone organique total (COT) a été estimé par digestion à l'acide chromique et à l'acide sulfurique pour oxyder la matière organique, puis titration en utilisant le sel de Mohrs.

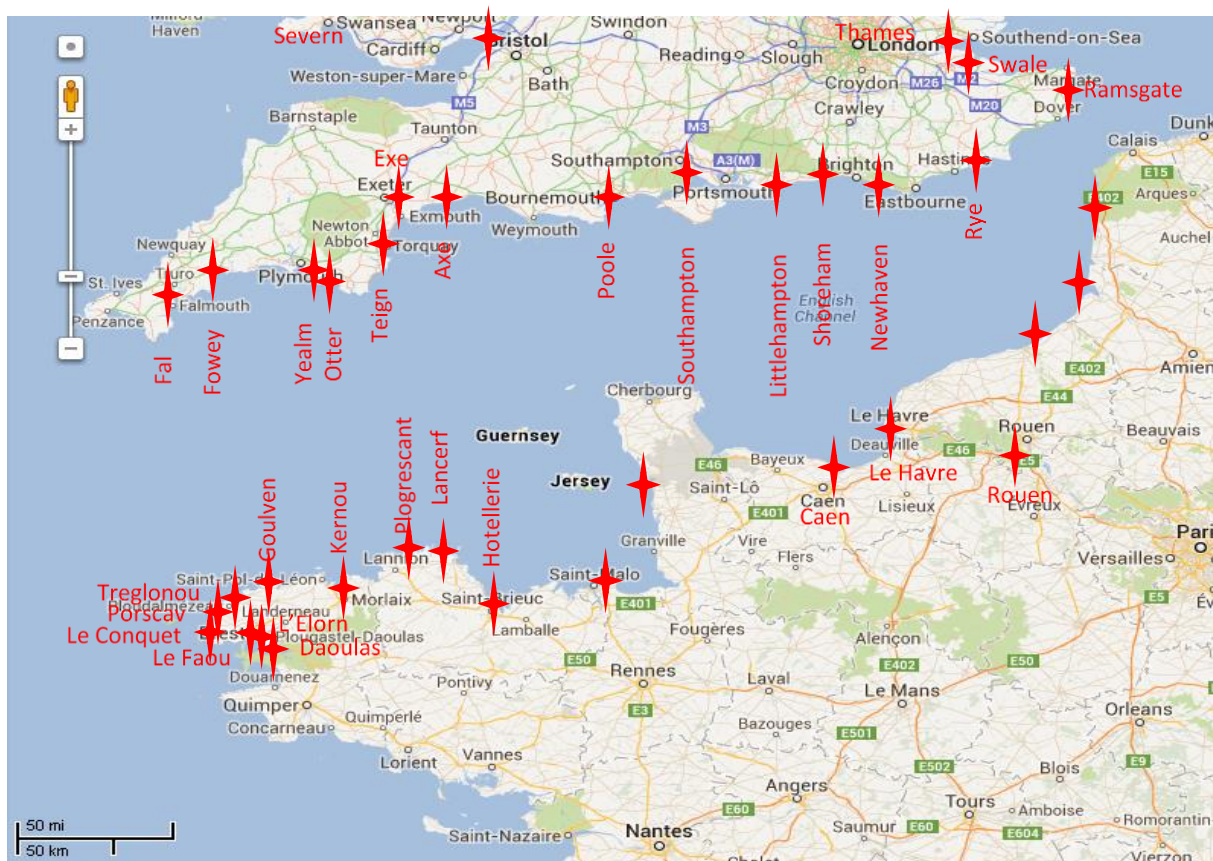


Figure 60. Principaux sites d'échantillonnage pour la mesure de l'activité anti-androgénique en 2009-2012.

Un aperçu de la méthodologie de l'extraction de sédiments est donné dans la figure 61. Les sédiments ont été extraits à l'acétone/méthanol par ASE. Le test AR-CALUX a été utilisé pour mesurer l'activité AA. Les résultats ont révélé que toute l'activité AA a été extraite avec 2 extractions ASE (voir tableau 16). Chaque palourde a été extraite deux fois avec 2 volumes d'acétone. Les extraits ont été combinés, filtrés et remis en suspension dans le DMSO pour une analyse AR-CALUX.

## Analytical Methods: Sediment

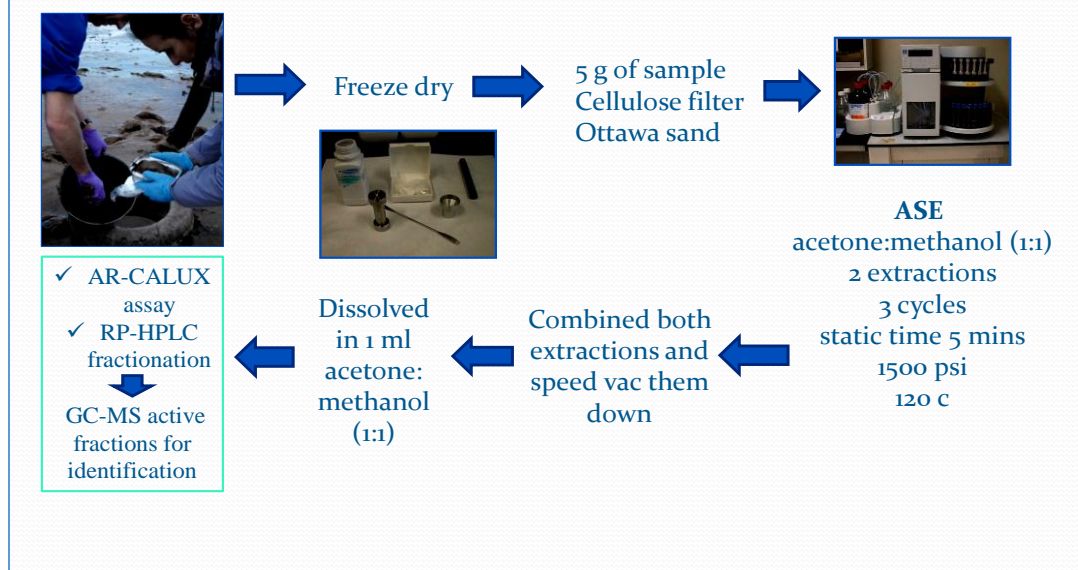


Figure 61. Schéma de la méthode d'extraction conduisant à la mesure de l'activité anti-androgénique.

Tableau 16. Caractéristiques de l'extraction des anti-androgènes des sédiments. Les sédiments ont été extraits séquentiellement 3 fois. Toute l'activité était extraite dès la seconde extraction. La limite de détection (LOD) = 0.2 µgFEQ/g sédiment sec.

Site	Anti-androgen activity ugFEQ/g dry weight sediment	% recovery 1 <sup>st</sup> ASE extraction MEOH/acetone	% recovery 2 <sup>nd</sup> ASE extraction MEOH/acetone	% recovery 3 <sup>rd</sup> ASE extraction DCM/hexane
Sterte	28.6	84.3	15.7	<LOD
Parkstone	48.2	91.9	8.1	<LOD
Minehead	22.5	82.7	17.3	<LOD
Wytch Farm	20.7	74.9	25.1	<LOD
Cracknore	17.0	100	<LOD	<LOD

Les niveaux d'activité AA dans les sédiments prélevés au sud du Royaume-Uni se situaient entre la limite de détection (LOD) et 220 pg d'équivalents flutamide (FEQ)/g de poids sec de sédiments. En France, ils étaient entre la LOD et 73 pg FEQ/g sédiments. Les estuaires de Southampton, Poole, Le Havre et Rouen sont les sites les plus contaminés (figure 62 A et B). Un nouvel échantillonnage effectué en 2013 des sites de l'estuaire de Southampton (à Northam et St Denys) a confirmé que ces sites étaient les plus pollués dans la région Interreg.

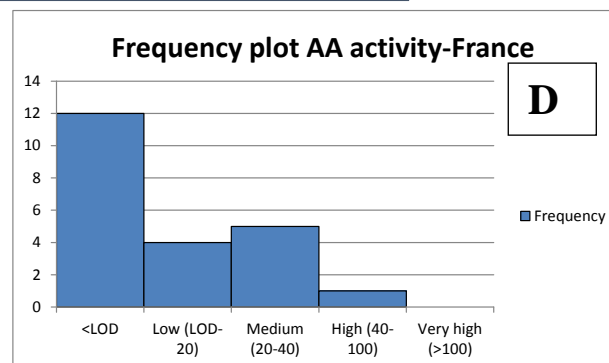
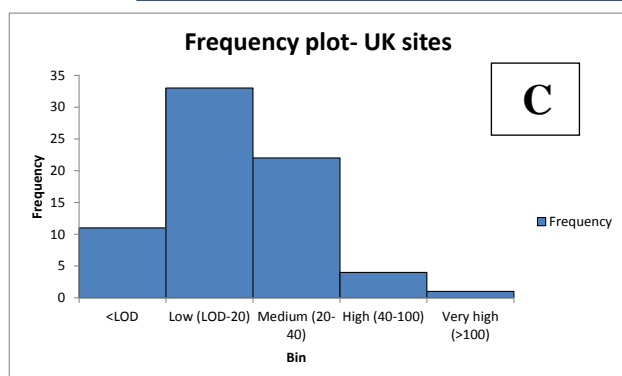
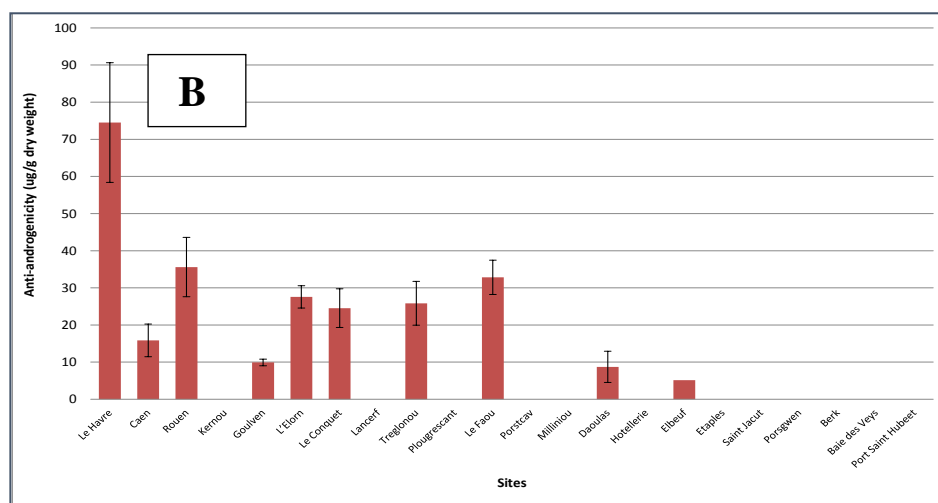
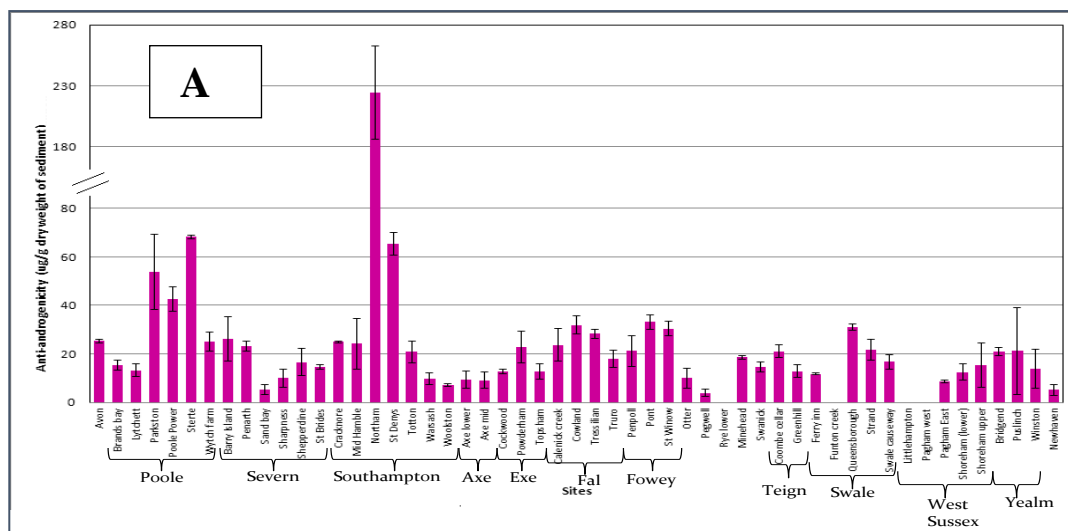


Figure 62. Activité anti-androgénique des sédiments côtiers de la région Manche. A) Niveaux des sites du Royaume-Uni. B) Niveaux des sites français. C) et D) : Fréquence des niveaux d'activité dans les sédiments au R-U et en France.

Les diagrammes de fréquence (Figure 62, C et D) ont révélé que plus de 88% des sites contenaient une activité AA supérieure à la limite de détection (LOD) de 1,0 µg FEQ/g de sédiment sec. Au total, moins de 5% des sites seraient classés comme hautement contaminées, avec une activité supérieure à 40 µg FEQ/g sédiments.

Pour de nombreux contaminants qui s'accumulent dans les sédiments, il y a une forte corrélation entre les niveaux d'accumulation et des caractéristiques telles que la taille des particules et



le contenu en carbone organique (COT). Un test de Kolmogorov-Smirnov a révélé que les caractéristiques des sédiments et les données AA ont tous suivi une distribution non normale et ainsi de coefficients de corrélation de Spearman ont été utilisés pour examiner les corrélations entre l'activité AA et le type de sédiments. Une matrice de corrélation a révélé que les activités AA dans les sédiments est fortement corrélé positivement avec le pourcentage de COT ( $R^2 = 0,554$ ) et également, dans une moindre mesure, avec la teneur en limon ( $R^2 = 0,286$ ) (Tab. 17, Fig. 63). Ce résultat est en accord avec les précédents rapports qui indiquent que de nombreux perturbateurs endocriniens, y compris certains anti-androgènes présents dans les eaux usées, sont modérément hydrophobes et sont susceptibles de s'associer avec la matière organique présente dans les sédiments (Janer et al., 2006). Nos résultats indiquent également que le pourcentage de COT est aussi fortement associée à la fraction de limon, ce qui peut expliquer la relation positive entre le niveau d'activité AA et le contenu de limon dans les différents sites (Tab. 17).

Table 17. Coefficients de corrélation de Spearman entre les activités anti-androgéniques (AA) des sédiments, la taille des particules et le pourcentage de carbone organique (TOC).

		Corrélations				
		activité AA	TOC	% argile	% sable	% limon
activité AA	Coefficient	1.000	.554***	.065	-.283**	.286**
	<i>P.</i>	.	.000	.529	.006	.005
	<i>n</i>	95	95	95	95	95
TOC	Coefficient	.554***	1.000	-.087	-.479***	.583***
	<i>P.</i>	.000	.	.399	.000	.000
	<i>n</i>	95	96	96	96	96
% argile	Coefficient	.065	-.087	1.000	-.011	-.199
	<i>P.</i>	.529	.399	.	.912	.052
	<i>n</i>	95	96	96	96	96
% sable	Coefficient	-.283**	-.479***	-.011	1.000	-.748**
	<i>P.</i>	.006	.000	.912	.	.000
	<i>n</i>	95	96	96	96	96
% limon	Coefficient	.286**	.583***	-.199	-.748***	1.000
	<i>P.</i>	.005	.000	.052	.000	.
	<i>n</i>	95	96	96	96	96

\*\*. Significatif à 0.01, \*\*\* à < 0.001 (2-tailed).

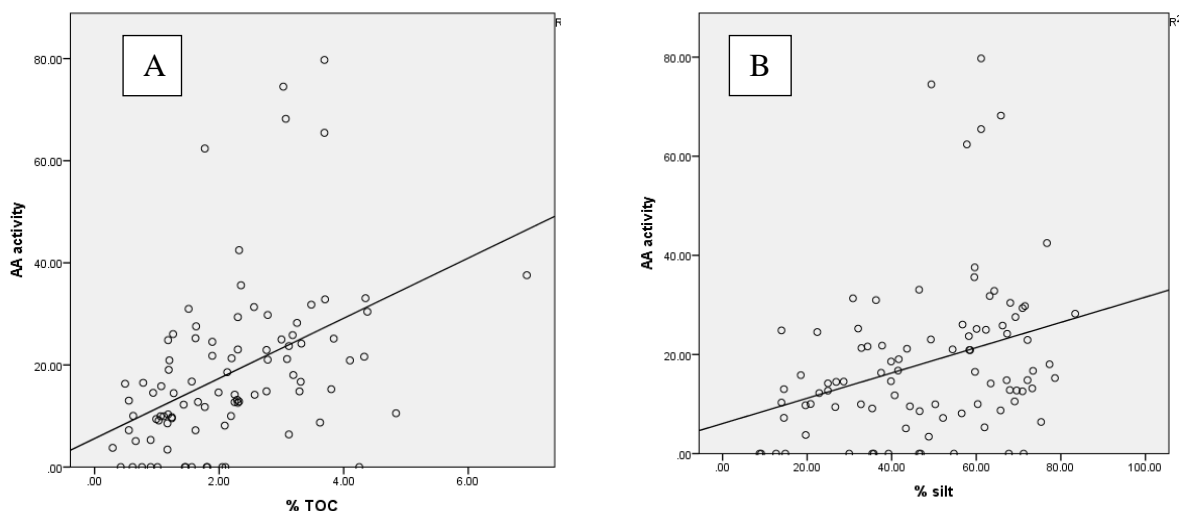


Figure 63. Relations entre les niveaux d'activité anti-androgénique (AA, en  $\mu\text{g FEQ/g}$  sédiment) et A) le pourcentage de matière organique (TOC) et B) le pourcentage de limon dans les sédiments. Les deux points les plus forts ( $\text{AA} > 150 \mu\text{g FEQ/g}$  sédiment) ont été omis.

Une activité œstrogénique a été détectée dans la plupart des sites britanniques à des niveaux de 120 à 353 pg d'équivalents d'œstradiol/g de poids sec de sédiments. Du côté britannique, les deux estuaires, Poole et Southampton, sont significativement contaminés à la fois par des composés à activité œstrogénique et à activité anti-androgénique. Nos résultats indiquent qu'il existe une pollution importante avec des perturbateurs endocriniens dans de nombreux sites côtiers. Ces contaminants ont le potentiel de démasculiniser organismes marins, et peuvent constituer une menace pour le développement normal et la reproduction des organismes vivants.



## IV.8. Analyse de l'imposex et de l'intersex chez les mollusques

### IV.8.1. Introduction

L'imposex est le développement de caractéristiques masculines (notamment pénis et urètre) chez des gastéropodes femelles. Il est souvent initié par des concentrations en TBT très faibles telles que  $0,5 \text{ ng.L}^{-1}$ . Cela empêche la ponte peut conduire à l'extinction des populations locales.



Figure 64: Le pourpre, *Nucella lapillus* (à gauche) – utilisé pour la mesure de l'imposex et la scrobiculaire, *Scrobicularia plana* (à droite) – un indicateur de l'intersex.

L'intersex (ou ovotestis) est la présence simultanée de tissus testiculaires et de tissus ovariens dans une même gonade. La plupart des invertébrés intersexués comme la scrobiculaire *Scrobicularia plana*, et certains poissons, contiennent généralement un petit nombre de cellules germinales femelles, ou ovocytes, dans une gonade à prédominance masculine (testicule), mais dans les cas graves, de vastes zones de tissu ovarien peuvent se développer dans le testicule. Chez certaines espèces, cela peut s'accompagner de perturbations fonctionnelles, de malformations et d'obstruction des voies reproductives mâles ou du développement de structures femelles importantes telles qu'un canal ou une cavité ovarienne.

L'induction de l'imposex chez les gastéropodes marins par le TBT reste l'exemple le plus remarquable de perturbation du système endocrinien. Le TBT, ou tributyl-étain, est un composé présent dans les peintures anti-salissures dont les effets négatifs ont été découverts dans les années 1960. À la fin des années 1970 et au début des années 1980, les perturbations observées chez les huîtres (*Crassostrea gigas*) du Bassin d'Arcachon ont conduit à l'interdiction du TBT en France. Parallèlement, à cette période, les chercheurs du Marine Biological Association (MBA) ont montré que le TBT était un perturbateur endocrinien exceptionnel pour les gastéropodes marins (notamment *Nucella lapillus*) provoquant la masculinisation (imposex) des femelles et le déclin des populations. La sensibilité de nombreuses espèces de gastéropodes marins du monde entier a conduit à leur utilisation comme bioindicateurs de la pollution par le TBT et à l'interdiction du TBT par de nombreux pays, dès les années 1990. Cependant le TBT contamine les sédiments où il peut rester pendant des décennies. La pollution a diminué le long de nombreuses côtes après la mise en place d'interdiction mais elle reste une préoccupation dans de nombreuses zones en raison de sa persistance, de la remise en suspension des sédiments de dragage et de l'utilisation illégale de TBT. La convention internationale de 2001 sur le TBT a conduit à l'interdiction générale du TBT dès 2003 et son élimination totale en 2008. L'effet de ces mesures législatives devrait maintenant être sensible et nous avons étudié cette hypothèse sur des sites sélectionnés en Manche.

L'ampleur et la signification des perturbations du système endocrinien dans les organismes marins et estuariens ne sont pas totalement appréhendés notamment chez les invertébrés. En tête de liste des priorités est l'obligation de développer les connaissances sur les symptômes et la probabilité d'impact des populations naturelles, y compris celles associées aux sédiments, où l'œstrogénicité peut prédominer (Langston et al 2007). Ainsi nous avons développé une méthodologie simple et pratique pour identifier les perturbations endocriniennes chez les populations de *S. plana*, afin d'en dégager les tendances spatiales et temporelles ainsi que les liens avec les causes anthropiques.

#### IV.8.2. Analyse de l'imposex et du TBT chez la nucelle, *Nucella lapillus*

Aujourd'hui, quatre ans après l'interdiction du TBT et 25 ans après les restrictions initiales sur les bateaux de plaisance, nous souhaitons établir si les sites précédemment touchés dans la région de la Manche ont été recolonisés par les nuelles et si l'imposex est encore présent. Les sites étudiés sont indiqués sur la figure 65. Pour la plupart de ces sites, les données recueillies en 2012/2013 sont comparées à des études précédentes, notamment celles de Gibbs et collaborateurs (1987).

La côte sud-ouest de l'Angleterre a de nombreux ports et marinas qui accueillent un nombre considérable de bateaux de plaisance et de nombreux sites ont été touchés par le TBT avant 1987 (Bryan et al, 1986). Les ports de Falmouth et Plymouth, sont le siège des effets les plus marqués et fournissent les «pires scénarios» pour une étude à long terme. Ces postes de surveillance à long terme comprennent également Castle Drive, au large de Falmouth, et Renney Rocks, près de Plymouth (sous l'influence des estuaires de la Tamar et de la Plym). Les études ont débuté ici en 1985 dans le cadre d'une vaste enquête pour obtenir des preuves du caractère généralisé de l'imposex et des tendances de son développement. En revanche, les sites de référence à Bude et à Bernardin sur la côte nord de la Cornouailles - beaucoup moins touchés par la navigation de plaisance - ont été examinées à divers intervalles au cours des 25 dernières années, y compris en 2012 dans le cadre du projet DIESE.

Le lien entre le TBT et imposex chez *N. lapillus* a été établi dans des expériences menées à Plymouth il y a 25 ans (Bryan et al 1986; Gibbs et al, 1987). Les indices établis alors (l'indice de la taille relative du pénis (RPSI) et l'indice de séquence de développement du canal déférent (VDSI) sont maintenant utilisés dans le monde entier et sont recommandés par la DCE, la Fisheries Services Research (FRS) et l'OSPAR (2008) comme un moyen de surveillance de la qualité de l'eau. Dans le cadre du projet DIESE ces mêmes méthodes ont été utilisées.

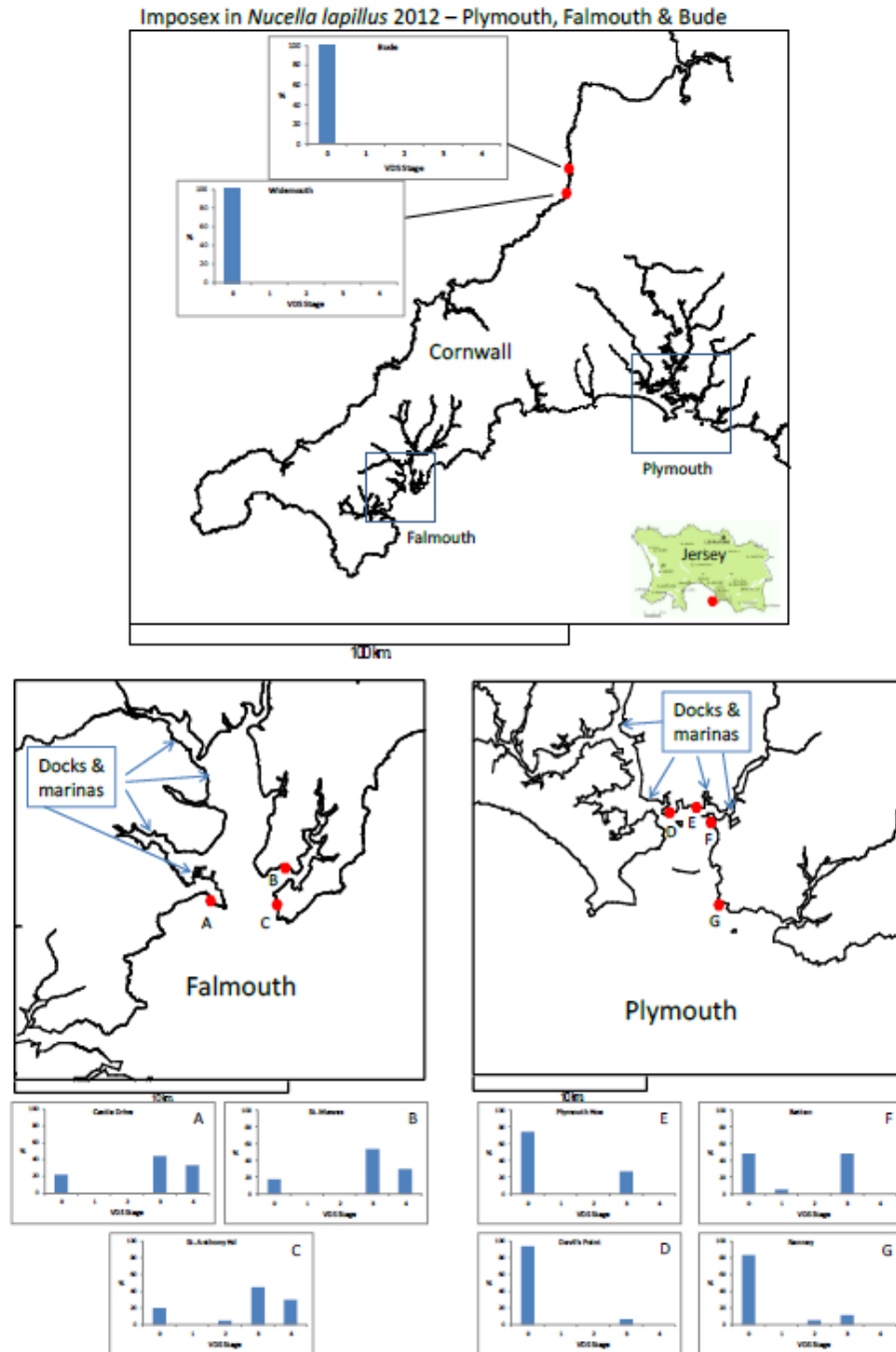


Figure 65: Cartes montrant l'emplacement des sites d'échantillonnage de nuelles, *Nucella lapillus* dans le sud-ouest anglais ainsi que les stade d'intersexualisation des populations locales.

L'imposex peut se développer à un âge précoce chez le pourpre et les femelles juvéniles semblent être les indicateurs les plus sensibles de la contamination à court terme. Cependant, comme *N. lapillus* est une espèce à longue durée de vie (6 ans et +) et que l'imposex est irréversible, la mesure chez des individus adultes peut être plus représentative de la réponse à l'exposition à long terme. Ainsi, 30 à 40 adultes ont été collectés par site, les coquilles retirées, et les tissus examinés sous microscope. Les animaux peuvent être sexés en notant la présence ou l'absence d'un pénis, et sa taille est mesurée. Chez les femelles, la zone située entre le pénis (s'il est présent) et les papilles génitales est soigneusement examinée et l'éventuel développement de l'urètre est mesuré, permettant d'assigner un

indice VDSI (1-6). Plusieurs femelles ont un petit pénis (en général <1 mm), sans aucun signe d'un canal déférent proximal ou distal. Ceux-ci sont notés avec un VDSI de 3.

Les deux indices enregistrés sont calculés selon les formules :

RPSI = (longueur moyenne du pénis des femelles/longueur moyenne du pénis des mâles) x 100 ;

VDSI = (total des indices de développement chez les femelles / nombre de femmes examinées).

Une mesure supplémentaire, basée sur le VDSI et recommandée dans la directive cadre sur l'eau, est le rapport sur la qualité écologique (RTE), qui est calculé ainsi: RTE = (6 - VDSI) ÷ 6, ce qui donne une fourchette de valeurs de 0 à 1.

Des échantillons ont été congelés pour l'analyse des concentrations en organo-étains (n = 6). Les méthodes utilisées sont celles décrites par Langston et al., (1994). La précision des méthodes d'analyse a été certifiée grâce à l'utilisation de sédiments ou de tissus de référence (tels que PACS-1).

Lors des pics historiques de concentration en TBT, les valeurs de RPSI dans le sud-ouest de l'Angleterre, pour des sites éloignés des centres de navigation de plaisance, étaient inférieurs ou égaux à 5%, tandis qu'ils atteignaient 40% près des ports. Des VDSI de 1 à 3 sont caractéristiques de zones propres, tandis que des scores de 4 à 6 sont typiques de zones contaminées (Gibbs et al 1987). Cependant, même dans les sites "propres" de la côte nord (sans indices de 5 ou plus) les populations montraient un imposex modéré (53 à 88 % au stade 3 et 4) pendant les années 1980 et, étonnamment, peu de femelles (<1%) étaient sans imposex. Ces populations sont cependant capables de se reproduire, contrairement aux populations stériles de Plymouth (à Batten Bay). Dans les cas extrêmes, cela a entraîné l'extinction des populations (à Plymouth Hoe par exemple). Toute population avec un VDSI supérieur à 4 est susceptible de contenir des femelles stériles et peut présenter une capacité de reproduction réduite.

Les niveaux actuels (2012) d'imposex sont indiqués dans le tableau 18. Le tableau 19 illustre les concentrations de TBT et DBT dans les tissus des nuelles femelles et mâles. La proportion de femelles présentant un imposex varie de 0% (Bernardin) à plus de 75% à Falmouth. Cependant, il est à noter que, bien que plusieurs femelles des trois sites de Falmouth (Castle Drive, St Anthony Head, St Mawes) aient un indice de 4, aucune femelle stérile n'a été identifiée. Il n'y a plus de trace de l'imposex, à Bude ou à Bernardin, et seulement de niveaux très faibles à Jersey.

Tableau 18: Niveaux d'imposex chez *Nucella lapillus* en 2012

Site	male penis			female penis			VDSI stages					VDSI	RPSI	EQR	percent with penis	percent female
	n	length	ad	n	length	ad	0	1	2	3	4					
Renney	17	3.30	0.36	18	0.06	0.19	15		1	2		0.0005	0.44	0.93	11.1	51.4
Tinside	11	3.57	0.42	19	0.18	0.33	14			5		0.0126	0.79	0.87	26.3	63.3
Devils Pt	15	2.82	0.43	15	0.03	0.13	14			1		0.0002	0.2	0.97	6.7	50.0
Seben	9	3.32	0.41	21	0.18	0.22	11	1		9		0.01	1.48	0.75	42.8	70.0
Castle Drive	26	2.63	0.32	9	0.77	0.53	2			4	3	2.46	2.67	0.56	77.8	26.7
St Anthony Hd	10	3.34	0.13	20	0.7	0.51	3		2	9	6	0.98	2.65	0.56	75.0	66.7
St Mawes	13	3.07	0.9	17	1.07	0.64	3			9	5	4.24	2.76	0.54	82.3	56.7
Bude	18	3.36	0.44	12	0	0	12					0	0	1	0.0	40.0
Widemouth	8	3.53	0.63	22	0	0	22					0	0	1	0.0	73.3
Meadfoot	13	3.76	0.26	22	0	0	22					0	0	1	0.0	62.9
Saltern Cove	16	3.82	0.32	19	0.21	0.35	12		1	5	1	0.015	1.10	0.82	31.6	54.3
St Agnes	12	4.09	0.36	23	0.06	0.29	21		1		1	0.0003	0.26	0.96	4.3	66.7
Porth Joke	14	4.03	0.21	21	0	0	21					0	0	1	0.0	60.0
Jersey	50	3.13	0.27	40	0.18	0.37	30		1	8	1	0.02	0.75	0.875	22.5	44.4

Tableau 19: Concentrations tissulaires en TBT et BBT chez *Nucella lapillus* en 2012

Site	Tissue organotin ( $\mu\text{g Sn/g dry wt}$ )							
	Female				Male			
	TBT	DBT	Total	%TBT	TBT	DBT	Total	%TBT
<b>Renney</b>								
Tinside	0.0332	0.0098	0.0429	77.3	0.0098	0.0103	0.0201	48.8
Devils Pt	0.0067	0.0090	0.0157	42.9	0.0015	0.0098	0.0098	15.2
Batten	0.0124	0.0148	0.0272	45.5	0.0282	0.0211	0.0493	57.2
Castle Drive	0.0267	0.0250	0.0517	51.6	0.0308	0.0189	0.0497	61.9
St Anthony Hd	0.0285	0.0229	0.0514	55.4	0.0118	0.0197	0.0315	37.5
St Mawes	0.0367	0.0207	0.0574	64.0	0.1503	0.0550	0.2054	73.2
Bude	0.0050	0.0040	0.0091	55.5	0.0207	0.0059	0.0266	77.9
Widemouth	0.0498	0.0076	0.0574	86.7	0.0317	0.0040	0.0358	88.8
Jersey	0.0064	0.0038	0.0102	62.8	0.0252	0.0012	0.0263	95.6

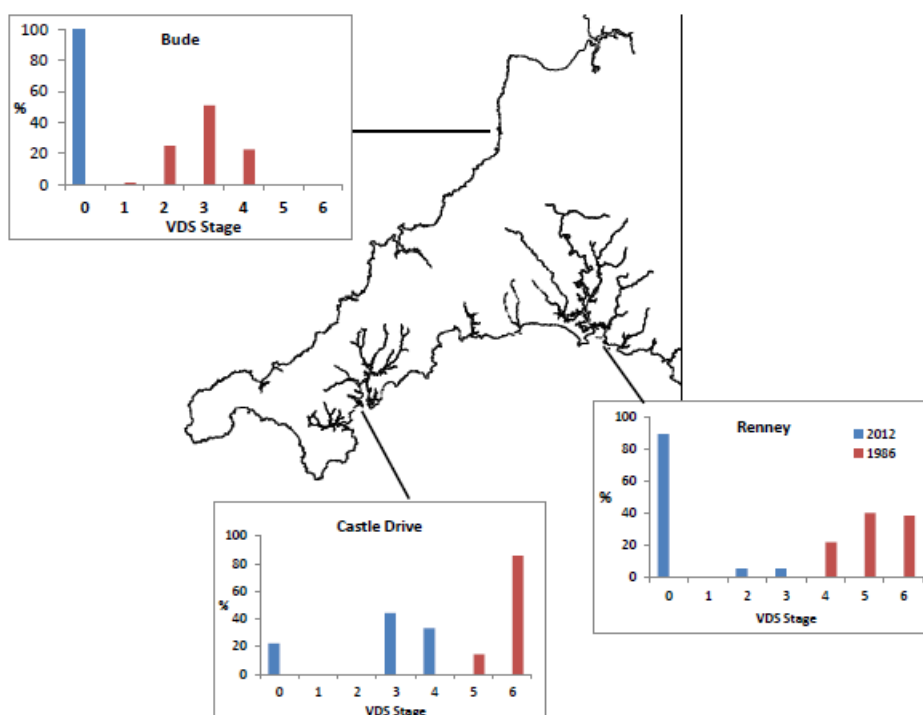


Figure 66: Répartition des stades VDSI dans les trois populations du sud-ouest anglais de 1986 à 2012.

Les variations temporelles détaillées des VDSI à Renney (en dehors de la baie de Plymouth) sont présentées dans la figure. 67. La majorité des changements se sont produits au cours des six dernières années

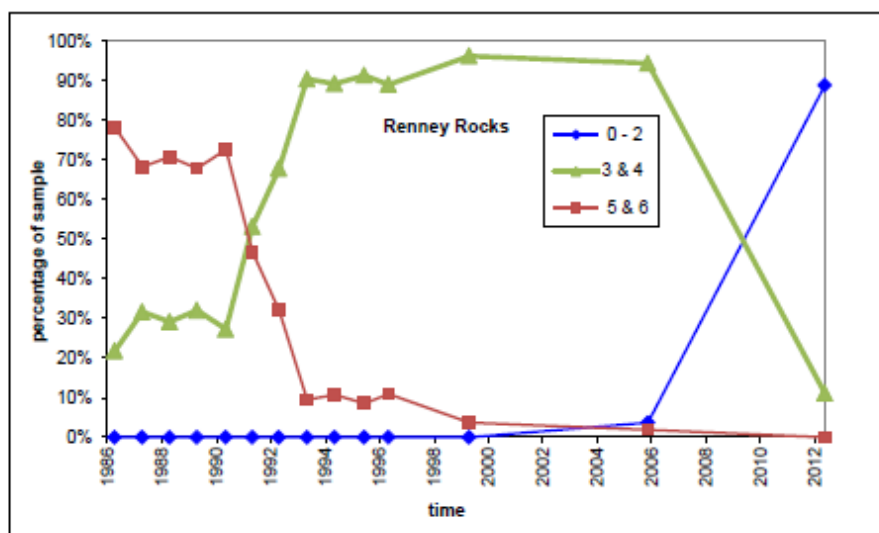


Figure 67. Évolution de la proportion des indices VDSI dans les populations de nuelles à Renney au cours des 25 dernières années.

L'étude de l'évolution des valeurs de l'indice VDSI à Castle Drive, Renney, Bude et Widemouth confirme l'amélioration de la condition des nuelles (Fig. 68) et la réduction des concentrations tissulaires en TBT (Fig. 69). Cependant l'amélioration est clairement moins marquée à Falmouth (Castle Drive) où la présence d'un port de plaisance et de sédiments contaminés peut compromettre l'amélioration.

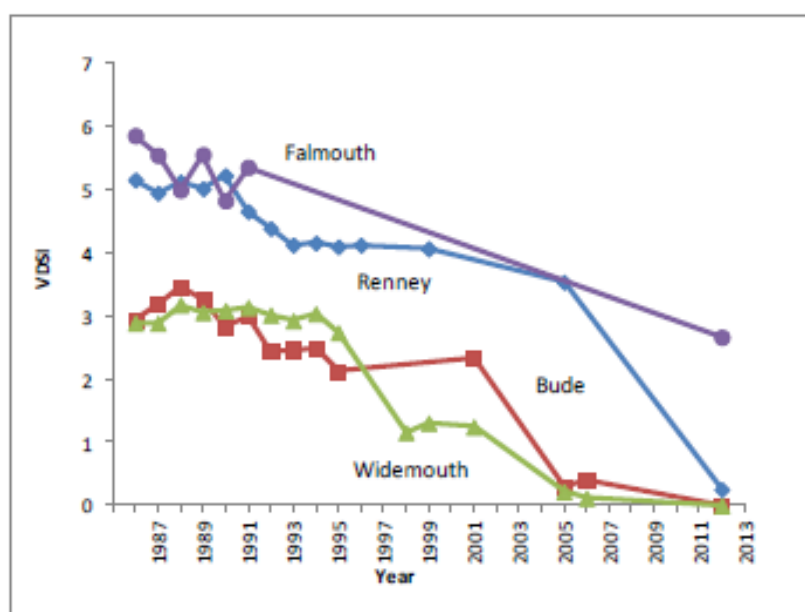


Figure 68: Evolution des VDSI moyens à Falmouth, Renney Rocks, Bude et Widemouth au cours des 25 dernières années.

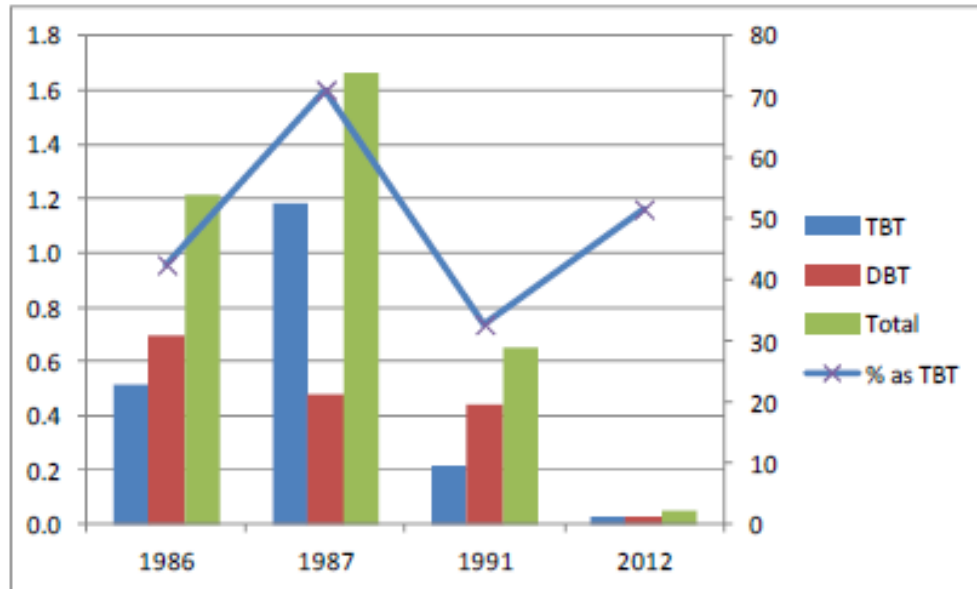


Figure 69: Evolution des concentrations tissulaires en organo-étain des nucelles adultes à Castle Drive, Falmouth (en µg Sn/g poids sec pour l'axe Y de gauche; en % de TBT pour l'axe Y de droite).

La relation entre les niveaux de TBT dans les tissus et le VDSI exprimées par les femelles adultes a montré une corrélation étroite (Gibbs et al., 1987). Bien que cette corrélation soit moins importante dans les échantillons récents (comme les concentrations tissulaires sont maintenant relativement faibles), la relation reste encore évidente (Fig. 70).

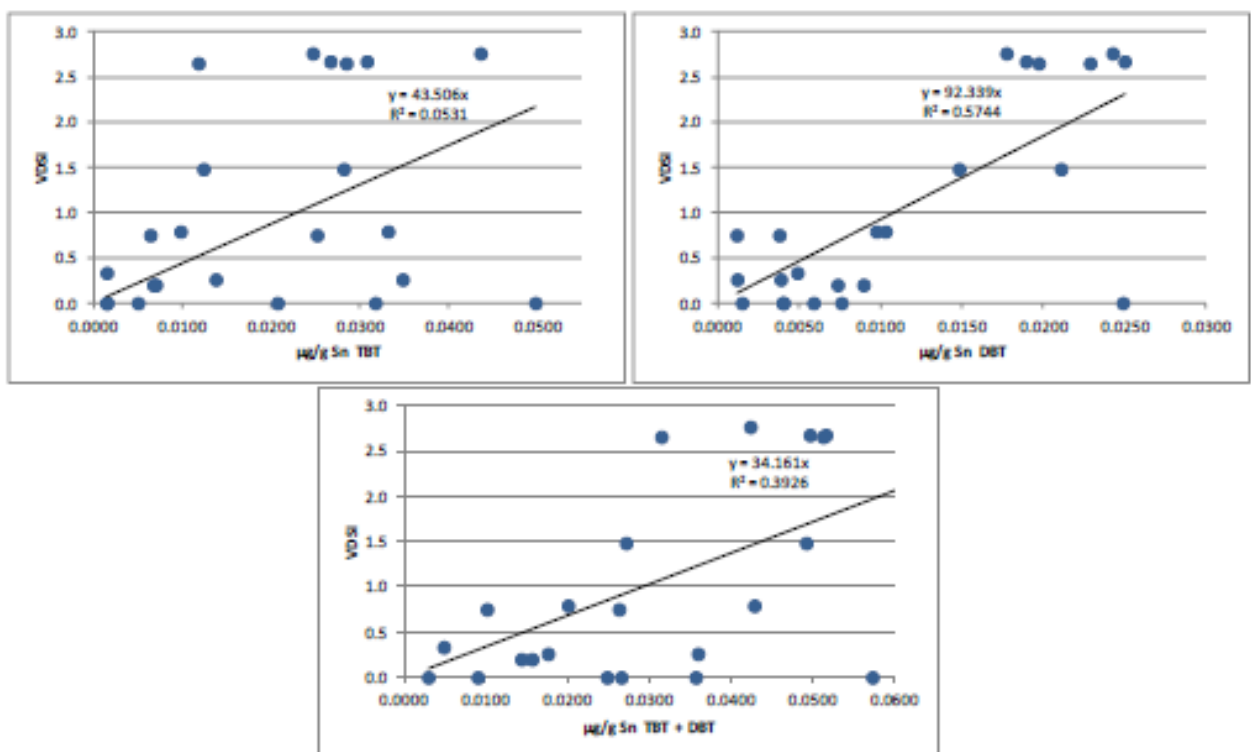


Figure 70: Relation entre l'indice VDSI et les concentrations tissulaires en organo-étain (TBT, DBT) dans les populations *Nucella lapillus* du sud-ouest de l'Angleterre (mesures 2012).

Les fréquences de distribution de taille de la population de nuelles à Plymouth en 1967, en 1985 (Bryan et al, 1986) et en 2013 sont présentées dans la figure 71. En général, les populations sans juvéniles indiquent une population vieillissante avec peu de recrutement (c'est-à-dire touchées par l'imposex), tandis que, au contraire, un large spectre de fréquences de taille est indicative d'une population durable.

Ainsi, la population de nuelles à Plymouth a presque récupéré de la chute de densité des années 1980 et présente des signes évidents de recrutement de juvéniles. Il est à noter que cela implique que le temps de récupération a été de l'ordre d'un quart de siècle.

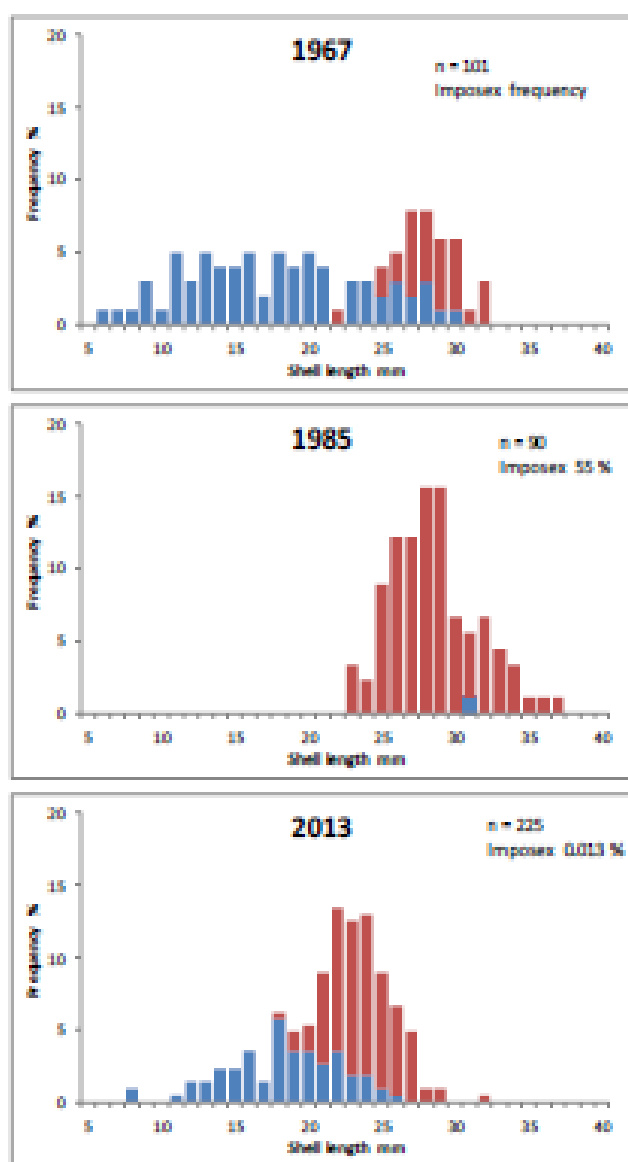


Figure 71: Fréquences de distribution de la taille de la population de *Nucella lapillus* à Plymouth depuis 1985.

La recolonisation des populations de nuelles après la législation des années 80 est lente en raison de la nature irréversible de l'imposex et du cycle de reproduction de *N. lapillus* où il n'y a pas de phase planctonique et donc une capacité de dispersion médiocre. Les résultats présentés ici montrent de façon évidente l'efficacité de la législation et la plupart des sites atteignent l'objectif définie par la convention OSPAR d'un VDSI inférieur à 2. Seuls deux des sites n'atteignent pas cet



objectif, Castle Drive et St Mawes dans l'estuaire de la Fal (et il est à noter que d'autres sites doivent encore rétablir leurs populations de pourpres après leur disparition au cours des années 1970 et 1980).

Les données recueillies et publiées par l'OSPAR (OSPAR, 2008), suggèrent que l'intensité de l'imposex était similaire à notre étude (la majorité des échantillons avec VDSI compris entre 0,3 et 5) et que les indices sont en baisse dans de nombreux sites: 24 des 134 séries chronologiques montrent une tendance à la baisse, probablement en lien avec la loi interdisant l'utilisation du TBT dans les années 1980. Plusieurs auteurs (Colson et Hughes, 2004; Huet et al, 2004; Birchenough et al, 2002; Moore et al, 2000; Bray et Herbert, 1998; Evans et al, 1994, 1995, 1996) ont produit des données en Bretagne qui sont pertinentes pour notre projet. Ainsi, les niveaux d'imposex dans la rade de Brest montrent une baisse entre 1992 et 2002, qui coïncide avec de faibles concentrations en TBT dans l'eau de mer (Huet et al., 2004). La relation globale entre la charge corporelle en TBT et l'imposex pour les sites du sud-ouest anglais (Fig. 70) montrent des corrélations cohérentes avec les relations initiales décrites par Gibbs et al (1987).

Les relations entre concentrations en TBT et imposex ont aussi été étudiées dans les estuaires de Southampton et de Poole. Ces études ont confirmé que les sédiments contaminés pourrait rester un problème pour de nombreuses années (peut-être encore 20-30 ans) malgré l'interdiction mondiale (voir Langston et al, 1994). Les décharges de matériaux contenant du TBT offshore sont également responsables d'effets marqués sur les niveaux d'intersexualité chez les gastéropodes (Santos et al., 2004). Cela a été l'un des facteurs qui a conduit à l'adoption de niveaux à ne pas dépasser pour le TBT dans les rejets de dragage.

Il a été suggéré que la législation sur le TBT a conduit à une reprise plus rapide au Royaume-Uni que dans les autres pays comme la France, l'Espagne et le Portugal (Ruiz et al., 2005). Cette hypothèse mérite plus d'attention. Une conclusion intéressante tirée de l'ensemble de données OSPAR est qu'il existe une variation locale importante - attribuée aux impacts des chantiers navals, aux ports et activités portuaires. Par conséquent l'état écologique peut varier de bon à mauvais sur seulement quelques kilomètres, en fonction des courants et de la proximité des points de rejets.

En conclusion, une la grande sensibilité et spécificité des nuelles vis-à-vis du TBT, la facilité avec laquelle l'imposex peut être déterminé et quantifié et la large distribution géographique tout au long de la Manche font des pourpres un indicateur exceptionnel pour le suivi des perturbations endocriniennes. L'observation de l'abondance et de la composition de la population permet également une évaluation de la capacité de reproduction. Combinées avec la chimie analytique, ces mesures constituent une indication fiable de l'impact du TBT, et de façon importante, de l'efficacité des mesures de gestion de l'environnement.

Il y a eu une nette amélioration de la pollution par le TBT sur de nombreux sites. Cependant, des effets délétères sont encore notables plus de deux décennies après les restrictions sur le TBT (délais en accord avec ceux décrits en Bretagne, par Huet et al 2004) et la diminution des impacts est surtout présente dans des sites côtiers très ouverts sur la mer tels que ceux du nord de la Cornouailles anglaise.

Dans l'ensemble, le rétablissement des populations de nuelles est toujours en cours, en lien avec la baisse des concentrations en TBT. Il s'agit d'une découverte importante car elle ajoute au poids de la l'évidence (s'il en était besoin) reliant le phénomène d'imposex avec le TBT. Cette association unique a déjà été mise en doute, et l'imposex attribué à d'autres causes. Les résultats présentés ici sont de nature à dissiper tous les doutes.

Toutefois, les taux de récupération peuvent varier considérablement selon les sites et nous avons encore besoin d'autres observations à long terme pour comprendre les conditions dans lesquelles le redressement est entravé. Même sur le littoral très ouvert en Cornouailles nord, le redressement des populations varie dans des sites adjacents tels que Bude et Bernardin. La prolifération d'algues toxiques à Bude en 1995 est peut-être un facteur confondant (Gibbs et al (1999).

Ainsi, malgré l'amélioration générale relativement rapide des populations, l'imposex est toujours présent dans un grand nombre de sites, mais à des niveaux faibles, et il y a encore des endroits contaminés où l'amélioration n'est pas sensible. Par exemple, les nuelles étaient abondantes

dans une grande partie de l'estuaire de la Fal dans les années 70 mais elles ont disparues dans les années 80 et restent absentes. En amont de Castle Drive, il n'y a aucun signe de recolonisation en 2012 indiquant que la recolonisation peut prendre un temps considérable. Cela est vraisemblablement lié, au moins en partie, à la persistance du TBT dans les sédiments et à la libération de TBT pendant le dragage et les opérations de maintenance des chantiers navals et des ports de plaisance (Langston et al., 2003; Langston et Burt, 2007). Ces situations illustrent la nécessité d'étudier les variations spatiales et temporelles des effets car ils fournissent des indications précieuses pour la gestion des scénarios de pollution marine.

#### IV.8.3. Intersexualité des Scrobiculaires en Manche

Divers composés naturels et artificiels dans les effluents domestiques et industriels sont capables d'altérer le processus de reproduction de la faune. La perturbation endocrinienne telle que la féminisation des poissons mâles dans les rivières, causée par (xéno) œstrogènes, est bien documentée (Tyler et al., 1998), tandis que l'ampleur des effets chez les invertébrés, notamment pour les taxons marins, est relativement inconnu. Cette étude a permis d'étudier le phénomène d'intersexualité présenté par la scrobiculaire, *Scrobicularia plana*, dans la région de la Manche, et sa relation avec la contamination des milieux.

Compte tenu du débat actuel sur la présence de perturbateurs endocriniens dans l'environnement marin, la question de savoir si les apports anthropiques peuvent influencer la sexualité et la reproduction des invertébrés aquatiques est particulièrement importante. Les invertébrés représentent 95% de toutes les espèces animales et sont au cœur de la fonction de l'écosystème (Defur et al., 1999).

Le mode de reproduction des mollusques bivalves varie du gonochorisme strict (individus à sexes séparés) à l'hermaphrodisme fonctionnel (Delgado et Camacho, 2002). Certains auteurs suggèrent aussi que certains bivalves peuvent basculer facilement entre mâles et femelles (Mackie, 1987). Les populations de scrobiculaires sont intrinsèquement gonochoriques, mais peuvent présenter une intersexualité sous certaines conditions et peuvent ainsi constituer des indicateurs potentiels de perturbation endocrinienne (Hughes, 1971; Rodriguez-Rua et al., 2003; Sola, 1997). Dans les populations du sud-ouest du Royaume-Uni, nous avons montré que la différenciation des gonades devient évidente au cours de Juin et du début Juillet pour la majorité des adultes qui présentent soit du sperme ou des ovocytes. Dans une étude de la population de l'estuaire Avon, nous avons constaté qu'un certain nombre des gonades mâles contiennent les ovocytes, en plus de spermatozoïdes (ovotestis ou intersexuées) (Langston et al., 2007).

Depuis, nous avons examiné les populations de *S. plana* dans les autres estuaires et découvert des degrés divers d'intersexualité avec des mâles comprenant, soit un seul ovocyte, des grappes d'ovocytes, des follicules ovocytaires entiers, et dans les cas extrêmes, des gonades femelles pratiquement totales. Alors que la proportion de femelles dans ces populations est inchangée (50%), les mâles sont féminisés à des degrés variables. En outre, cette condition semble inductible par certains composés chimiques (Langston et al., 2007).

Sur la base de ces observations et le programme a été développé pour examiner la gravité et la fréquence de l'intersexualité dans toute la région Manche durant les quatre années du programme DIESE. Un objectif clé est d'évaluer les effets à long terme de l'activité anthropique sur la sexualité et la reproduction des scrobiculaires.

Afin d'utiliser des séries chronologiques d'indicateurs chimiques et biologiques, il a semblé intéressant d'étudier les populations de *S. plana* sur des sites où les sédiments sont une source persistante de TBT. Les études ont inclus une mise à jour de la mesure de la pollution de TBT dans le port de Poole et de Southampton et une évaluation des populations. Ainsi, la méthodologie pour

l'évaluation des populations de palourdes, conçus à l'origine pour étudier l'impact du TBT a été appliquée à l'étude des effets de la féminisation de *S. plana* tout au long de la région Manche.

Au cours de la première année du projet (2009), le groupe MBA a réalisé une campagne d'échantillonnage sur le terrain. Au total, 19 sites ont été échantillonnés (Fig. 72 et 73) et divers paramètres tels que la taille des sédiments (granulométrie laser), la teneur en matière organique (traitement thermique à 400 °C), les concentrations en composés organostanniques (TBT et DBT) et une gamme de métaux (à la fois anthropiques et géogéniques pour aider à répartir les contributions relatives de ces sources) ont été relevés. Ces méthodes sont largement calquées sur celles décrites dans les études précédentes (Langston et al, 1999; Ridgway et al, 2003). Les sous-échantillons (sédiments et palourdes) ont également été distribués aux partenaires du projet pour une caractérisation moléculaire et chimique supplémentaire. La mesure des effets sur les individus (fréquence d'intersexualité, gravité et sex-ratio) a été combinée avec des mesures de composition de la population et des mesures chimiques.

La fréquence et la gravité des intersexués, mesuré par l'examen histologique des gonades par microscopie optique, sont basées sur les techniques décrites précédemment (Langston et al., 2007), en utilisant un échantillon de 30 palourdes à chaque site. Les sex-ratios sont également déterminées (test exact de Fisher,  $p < 0,005$ ). Pour compléter le programme de terrain, la macrofaune benthique a été échantillonnée afin d'établir des liens entre les réponses biologiques (abondance des juvéniles et des adultes, perturbations histologiques (intersexués), et contamination.

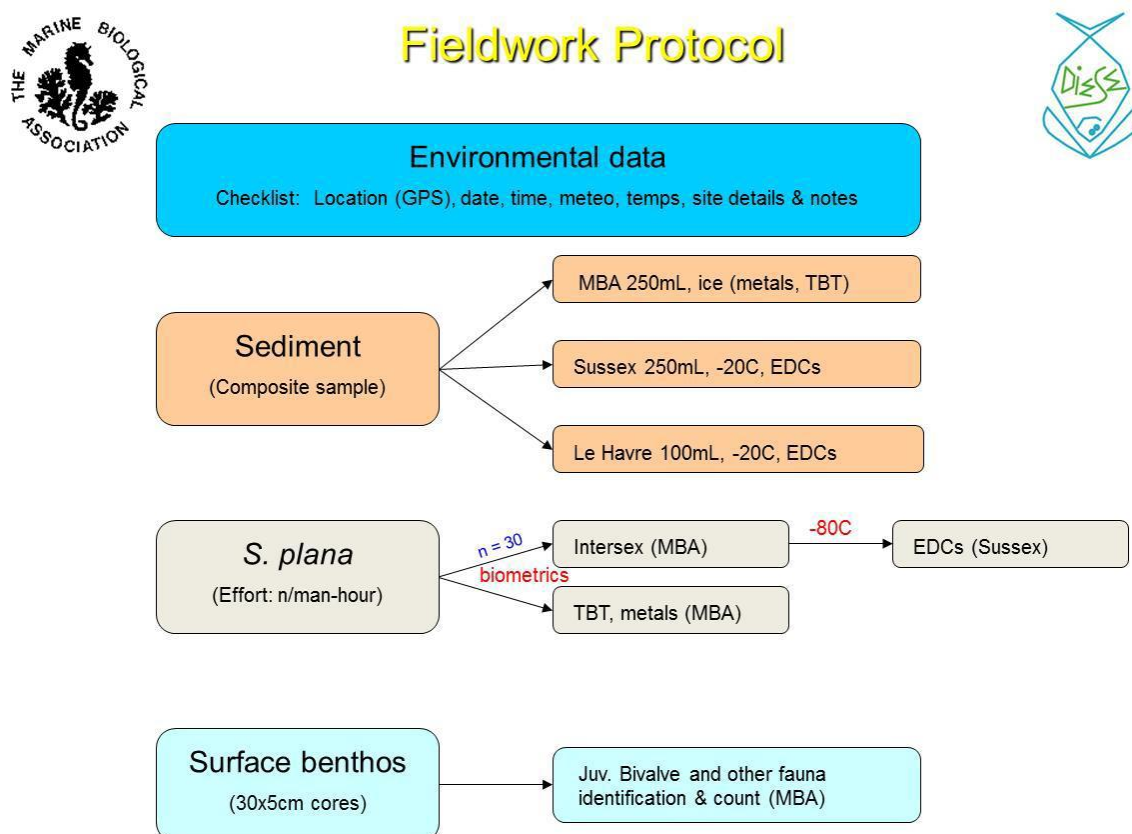


Figure 72: Programme d'étude de l'intersexualité des scrobiculaires

L'échantillonnage a été défini pour donner une mesure semi-quantitative de l'abondance. Parallèlement à l'échantillonnage des scrobiculaires et des sédiments de surface, l'échantillonnage du benthos de surface a été entrepris dans la plupart des sites estuariens visités. L'objectif étant de fournir un aperçu de la structure de la communauté benthique à chaque site et d'établir des liens entre ces communautés et de la chimie des sédiments.

Les populations juvéniles ont été prélevées à partir de 30 carottes (6,4 cm de diamètre et 2 cm de profondeur). Chaque échantillon de site a été regroupé (pour une superficie totale de 0,0956 m<sup>2</sup>) et stocké jusqu'à leur retour au laboratoire, où ils ont été tamisés (1 mm) et lavés doucement avec l'eau de mer. Les échantillons, ont été fixés avec du formol à 4%. Du colorant Rose Bengale, a été ajouté aux échantillons pour faciliter le tri.

Après lavage, les échantillons ont été triés sur un plateau peu profond et transférées dans un flacon approprié, une pour chaque groupe d'organismes. De l'éthanol à 70% a été ajouté à chaque flacon afin de préserver les échantillons avant l'identification. Les individus ont été identifiés jusqu'à l'espèce lorsque cela était possible, et comptés.

En 2010, le travail a été étendu à la région du centre et de l'est de la côte anglaise entre Selsey Bill et le Medway puis, en 2011 et 2012 à la côte française (Fig. 73).

Des expositions expérimentales ont été réalisées avec des sédiments dopés (contaminés volontairement) pendant un mois au début de la gamétogenèse (février-Mars), suivis par un transfert des scrobiculaires sur le terrain où ils ont été récupérés après maturation en Juillet.



Figure 73: Sites d'échantillonnage des scrobiculaires (71 britanniques et 37 français). Les échantillons présentant des individus intersexués sont notés par une étoile rouge.

Les scrobiculaires se sont avérées être un excellent modèle pour étudier l'étendue et l'évolution de l'impact du TBT. Ceci est illustré dans les deux exemples ci-dessous issus des échantillons prélevés dans l'estuaire de Southampton. Dans l'estuaire Hamble (dominé par les bateaux de plaisance), les populations ont été touchées pendant les années 1980 jusqu'à ce que la conduite à une réduction des résidus TBT. En 2009, au début du projet DIESE, le nombre de scrobiculaires était revenu à des valeurs similaires à celui établi deux décennies auparavant (Fig. 74).

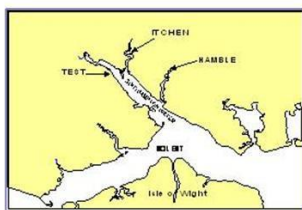
La recolonisation de l'ensemble de l'estuaire semble avoir été plus lent en raison de la prédominance des navires commerciaux et des quais (Fig. 75). La législation sur ce secteur n'était pas



pleinement efficace avant les restrictions globales en 2008. Cela se traduit par un retard dans la réduction de la concentration en TBT et un recrutement irrégulier. Il reste à voir si cette reprise sera durable.

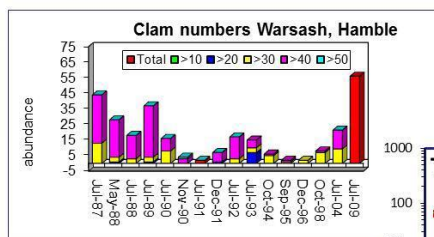
## TBT & *Scrobicularia plana*

### Southampton Water



This study highlights how TBT was responsible for clam population decline in the 1980s and 1990s. Recovery is occurring at most sites, but rates vary as a function of TBT persistence (sediment) together with earlier usage patterns (leisure versus commercial fleet).

Recovery is most striking at small-boat dominated sites such as the Hamble Estuary



Clam numbers improving as TBT approaches EQS

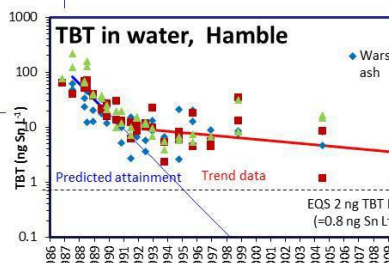


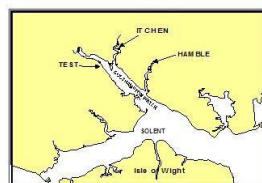
Figure 74: Evolution des populations de scrobiculaires dans l'estuaire Hamble (Warsash) montrant la recolonisation en réponse à la réduction des concentrations en TBT.

### Recovery in Test Estuary slower, less sustained due to inputs from commercial fleet



#### Test Estuary:

TBT inputs from large vessels, repair yards and sediments remain a concern



Initial ban on small vessels ineffective here: TBT levels have only recently started to fall but remain >EQS

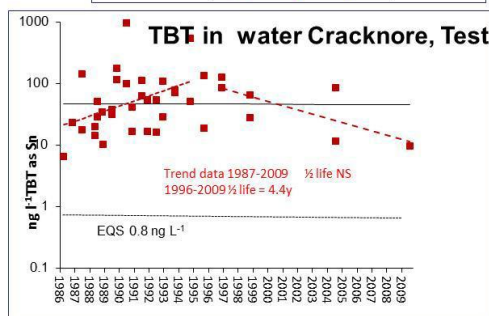
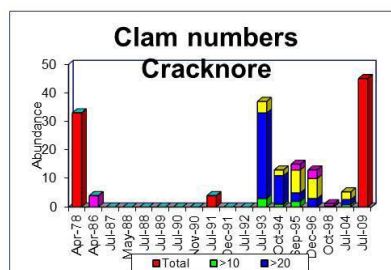


Figure 75: Evolution des populations de scrobiculaires dans l'estuaire de Southampton (Cracknore) montrant une reprise erratique des populations associée à la lente diminution des niveaux de TBT.

Bien que des individus intersexués n'aient pas été trouvés à chaque site, peu d'estuaires présentent des populations indemnes. Ainsi, dans l'estuaire du Tamar, près de Plymouth, l'incidence de l'intersexualité varie de 0% à 25% (moyenne de 9%). Parmi les sites échantillonnés en 2009, l'estuaire de la Severn montre des niveaux d'intersexualité élevés et des sex-ratios en faveur des femelles (Fig. 76). L'estuaire de la Severn, fortement industrialisé et urbanisé, présente des niveaux élevés de contamination par les métaux. L'incidence de l'intersexualité dans des sites tels que l'estuaire de l'Avon (Devon) est peu susceptible d'être dû à l'industrialisation car la zone est essentiellement rurale, mais les eaux usées et les rejets de l'agriculture sont des sources possibles de composés perturbateurs.

Les données de chimie des échantillons de 2009 indiquent la présence de composés anti-androgéniques dans un certain nombre de sites (voir le chapitre deux du présent rapport), ce qui suggère une contamination généralisée par des produits chimiques qui ont le potentiel de féminiser les scrobiculaires. Cependant, les observations préliminaires concernant la distribution de la contamination anti-androgénique et l'incidence de l'intersexualité ne permettent pas d'établir une relation de cause à effet. De même, des essais d'exposition avec des anti-androgènes n'ont pas révélé d'effets de féminisation forts. Il n'est pas inconcevable cependant que les effets observés puissent être plus manifestes en présence d'un mélange incluant des composés œstrogéniques.

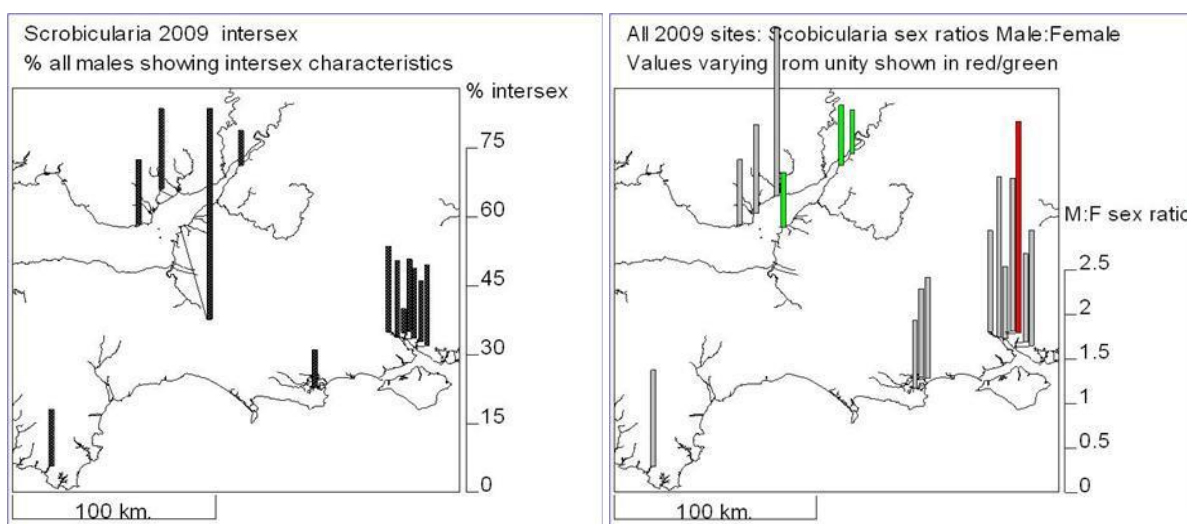


Figure 76: Sex-ratio de deux populations de scrobiculaires de l'estuaire de la Severn et à Southampton montrant des prédominances de femelles.

Des individus intersexués étaient présents dans 12 des 32 populations échantillonnées en 2010 (Fig. 77). De forts taux d'intersexualité (10-20% des mâles) ont été trouvés à Pagham et dans le Yealm. Plus de la moitié des sites examinés ne présentait pas d'intersexués (drapeaux bleus de la figure 77). Le sex-ratio est biaisé significativement à un petit nombre de sites.

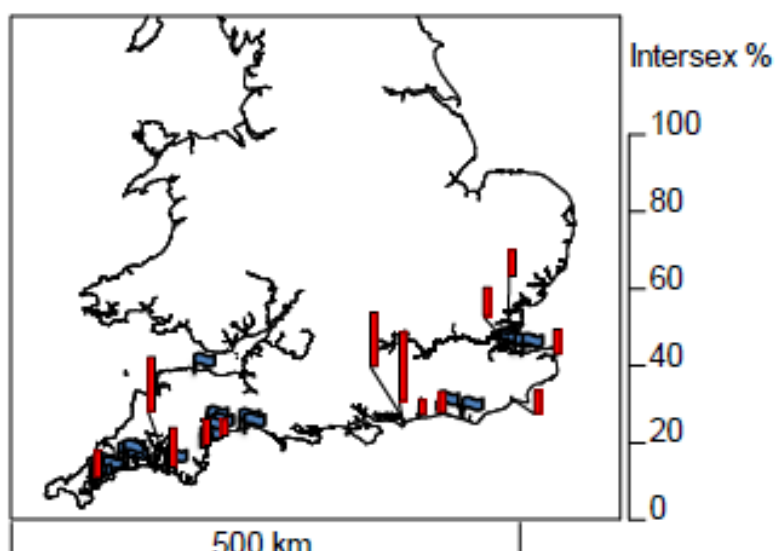


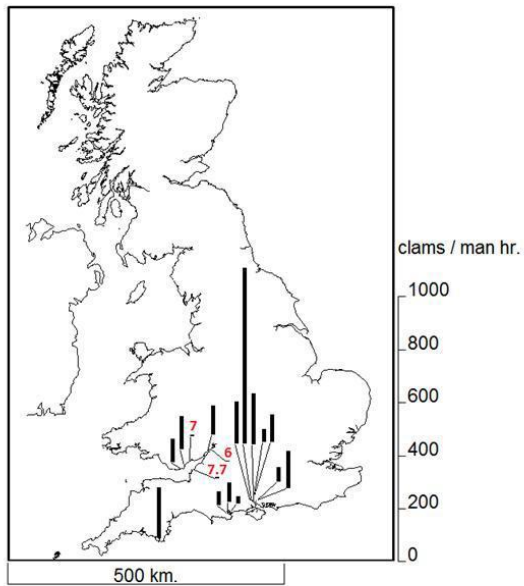
Figure 77: Sites d'échantillonnage et incidence de l'intersexualité chez *Scrobicularia plana*, en 2010.

En France, en 2011, deux sites (Berk et Etaples) présentaient environ 50% d'intersexuées. Ailleurs les niveaux d'intersexualité proches de 10%. A St Benoit cependant la population était fortement biaisé en faveur des femelles alors qu'à Porsgwen il y avait plus de mâles. En 2012, environ 70% des 37 populations de *S. plana* recueillies sur les sites français, et 52% des 71 sites de la Manche du Royaume-Uni présentaient des intersexués. Les sex-ratios ont été parfois biaisés (six populations biaisé en faveur des mâles, sept pour les femmes) mais la moyenne est proche de l'unité (1,04) pour les échantillons du Royaume-Uni, et légèrement biaisé en faveur des femelles (0,917) dans les échantillons français.

L'étude des tendances temporelles a été particulièrement suivie dans l'estuaire Avon dans le sud ouest en Angleterre, où les niveaux d'intersexualité sont élevés. Les niveaux d'intersexualité ont diminué ces dernières années et peuvent indiquer une amélioration de la qualité de l'eau peut-être liée à un changement des pratiques agricoles couplée à une baisse globale du troupeau laitier national. De toute évidence, bien que l'agriculture soit une source potentielle de féminisation, différentes sources peuvent contribuer aux effets observés. Dans les expériences de laboratoire, nous avons observé une augmentation de l'intersexualité chez *S. plana* après une exposition à des mélanges d'œstrogènes (17 $\beta$  œstradiol) et de xéno-œstrogènes (nonylphénol) (test exact de Fisher,  $p < 0,05$ ) (Langston et al. 2007). Le BPA (bisphénol A) a été peu efficace, ainsi que l'Irgasan (triclosan), même si ce dernier composé a engendré une légère modification dans le sex-ratio (plus de femelles).

Le nombre total de scrobiculaires adultes échantillonné par heure sont présentés dans la figure 78A. De faibles effectifs (en rouge) caractérisent certains sites de l'estuaire de la Severn et coïncident avec une forte proportion d'intersexuées sans qu'il soit possible d'établir de lien de cause et l'effet de façon définitive. Les juvéniles de scrobiculaires étaient présents en petits nombre dans cinq des carottes prélevées en 2009 (Fig. 78B), mais étaient absents de la majorité des sites, y compris ceux de l'estuaire de la Severn. Les résultats indiquent cependant que les juvéniles de *S.plana* sont plus nombreux que ceux d'autres espèces. *Macoma balthica* et *Abra tenuis* ont tendance à dominer dans la Severn et à Poole et Southampton.

**A**  
Total adult *Scrobicularia plana* collected per man hour  
Summer sampling 2009



**B**  
Total juvenile *Scrobicularia plana*  
Summer sampling 2009

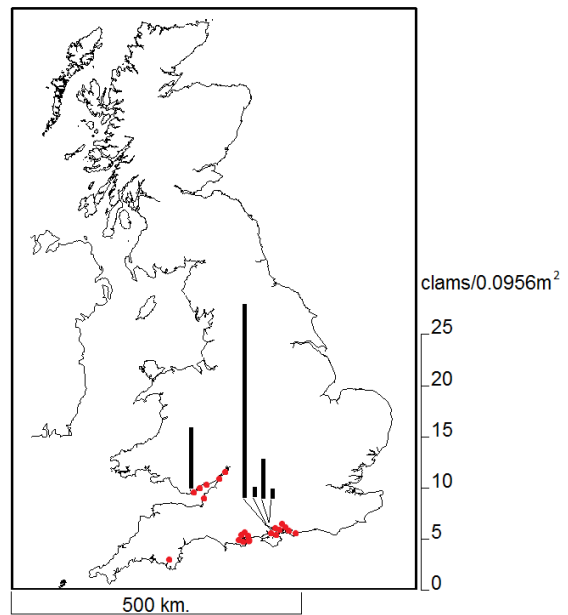


Figure 78: Abondance de scrobiculaires dans les sites échantillonnés en 2009 exprimés en quantités prélevées par personne et par heure (A) et en densité dans les carottes (B).

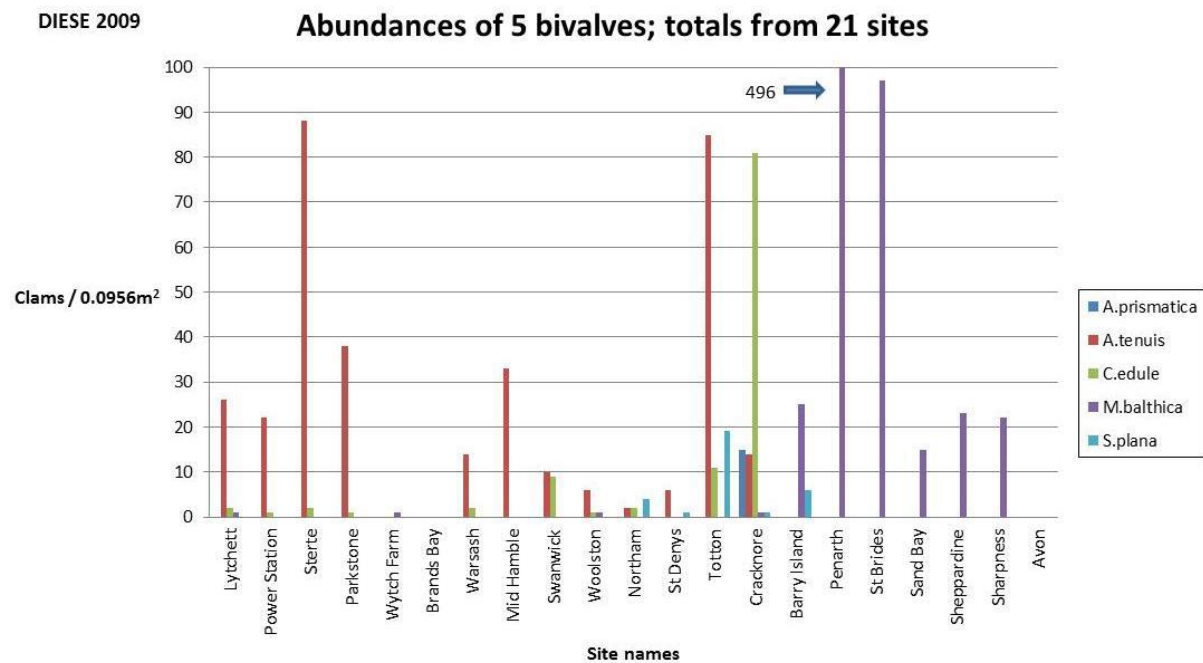


Figure 79: Abondances des bivalves dans les échantillons de carottes intertidal de 2009.



L'analyse typologique des assemblages de la macrofaune permet de comparer les similitudes et les différences entre sites (Fig. 80). Ainsi les sites de la Severn semblent distincts des autres sites de la Manche.

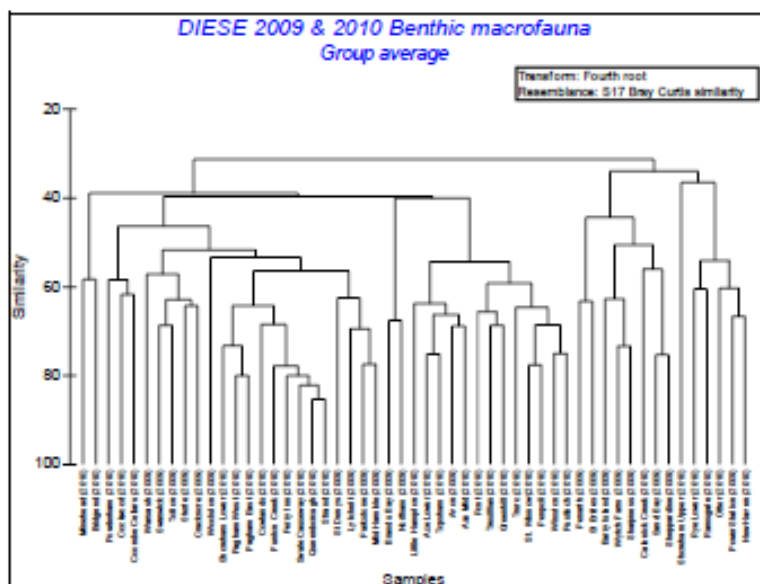


Figure 80: Analyse des similitudes des assemblages de macrofaune sédimentaire en 2009 et 2010.

Les composés chimiques montrent des distributions distinctes selon les sites de la Manche comme en témoigne les concentrations de cuivre dans les sédiments (Fig. 81). Les valeurs de Cu (mg g<sup>-1</sup>dw) dans des échantillons de sédiments sont indiquées avec les indices de qualité définis par les lignes directrices de la qualité des sédiments (RPQS provisoires pour Cu = 18,7 mg g<sup>-1</sup>; CCME, 1999). La RPQS équivaut niveau de seuil d'effet (TEL) c'est-à-dire les concentrations en dessous desquelles des effets biologiques sont peu probables. Le PEL est le seuil au-dessus duquel, les effets sont probables (PEL = 108 mg Cu g<sup>-1</sup>). Plusieurs sites dans les zones du sud-ouest anglais et de la région de la Tamise dépassent le TEL et le PEL.

Aucun sédiment français ne dépasse le PEL et la plupart étaient inférieurs au TEL pour le cuivre. Il convient toutefois de noter que cela peut refléter la granulométrie plutôt que (l'absence de) la contamination. Beaucoup de sédiments français étaient plus sableux (plus gros) que les limons représentatifs des sites estuariens du Royaume-Uni.



Figure 81: Concentrations en cuivre ( $\text{mg g}^{-1}$  de poids sec) des échantillons de sédiments par rapport aux niveaux d'effets probables (PEL) et du niveau sans effets (TEL).

En conclusion, l'intersexualité est largement répandue chez les scrobiculaires de la Manche et constitue un excellent indicateur de perturbations endocriniennes. Alors que l'intersexualité est principalement à un niveau faible (10% ou moins de mâles affectés), il ya des sites qui sont clairement fortement impactés (avec 50% des mâles affectés) et certaines populations où les sex-ratios sont biaisés (parfois en faveur des mâles, parfois en faveur des femelles), probablement en raison de facteurs d'origine anthropique. Ainsi, bien que les causes de l'intersexualité restent spéculatives, ce travail montre que le phénomène est largement répandu dans la zone Manche et qu'il est inductible par des perturbateurs endocriniens connus. D'autres études cependant sont nécessaires pour définir, de façon plus adéquate, les véritables niveaux de base, le lien entre les perturbations endocriniennes et les facteurs anthropiques, et pour décrire, de façon fine, l'ampleur des impacts à l'échelle des bassins versants.

L'exemple de l'estuaire de la Severn montre que de forts taux d'intersexués sont accompagnées par une faible abondance juvéniles et d'une composition macrofaunique quelque peu inhabituelle. Cependant d'autres travaux sont nécessaires pour confirmer les liens entre les perturbations du système endocrinien (indiquée par la fréquence des intersexués), la fécondité, la densité de la population et les conséquences sur les communautés et l'écosystème.

## IV.9. Cartographie de la mutagénéicité des sédiments en Manche

### IV.9.1. Introduction

De nombreux composés naturels ou de synthèse sont des cancérrogènes potentiels ou avérés et identifiés comme tels dans la réglementation européenne (règlement CLP 1272/2008). Parmi ceux-ci, les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP), l'hexachlorobenzène, l'hexachlorocyclohexane (HCH), le méthyle mercure et le cadmium apparaissent sur la liste des onze substances dangereuses prioritaires de la Directive Cadre Européenne sur l'eau (Directive 2000/60/CE). En raison de leur large utilisation et/ou de leur stabilité physico-chimique ces composés sont présents en quantités non négligeables dans la plupart des grands estuaires européens et nord-américains fortement urbanisés et industrialisés (Budzinski et al., 1998 ; Yunker, et al, 1999).

Le caractère mutagène ou génotoxique de certaines molécules peut s'exprimer directement, c'est-à-dire sans modification lorsqu'elles interagissent avec les molécules biologiques de l'organisme, ou indirectement après une étape dite de « bioactivation ». Cette bioactivation est issue de l'action des enzymes de l'organisme qui transforment la molécule afin de pouvoir l'éliminer plus facilement. Cependant, dans ce cas précis de bioactivation, la transformation génère un composé très réactif et éventuellement mutagène. Il y a donc production d'un composé plus dangereux que le composé parent. L'objectif de ce travail était donc d'évaluer le potentiel mutagène d'extraits sédimentaires prélevés le long des côtes françaises et britanniques grâce à l'utilisation d'un test de mutagénéicité, le SOS Chromotest.

Le SOS Chromotest est un test *in vitro* qui permet d'évaluer l'activité génotoxique d'une substance pure ou d'un échantillon biologique ou environnemental. Ce test est effectué sur une souche bactérienne, *Escherichia coli* PQ37 (Quillardet et al, 1982). Il consiste à déterminer *in vitro* la capacité d'une substance chimique à induire des dommages à l'ADN qui seront quantifiés indirectement par la mesure de l'expression d'un des composants du système de réparation SOS, le gène *sfhA*. Dans cette souche bactérienne, le gène *lacZ*, responsable de la synthèse de la  $\beta$ -galactosidase a été placé sous le contrôle du promoteur *sfhA*. Ainsi, lorsque l'ADN bactérien est endommagé par un génotoxique, le système de réparation SOS est activé, ce qui conduit à l'induction du gène *lacZ* et à la synthèse de l'enzyme  $\beta$ -gal dont l'activité est quantifiée par dosage colorimétrique (apparition d'une couleur jaune) à 405 nm. L'activité de la  $\beta$ -gal est comparée à l'activité de la phosphatase alcaline (PAL) mesurée en parallèle, qui constitue à ce titre un standard interne puisque non inducible par des agents génotoxiques. Afin de pouvoir détecter les génotoxiques indirects dits progénotoxiques, un système d'activation métabolique, la fraction S9, est ajouté au milieu de culture. Cette fraction apporte les enzymes nécessaires (cytochromes P450) à l'activation métabolique des progénotoxiques. L'activité génotoxique, pour une concentration *c* d'échantillon, est exprimée par le ratio  $Rc = \beta\text{-gal}/\text{PAL}$ . Le facteur d'induction, IF, est défini par le rapport  $Rc/Ro$  ou *Ro* est le ratio mesuré pour un témoin négatif (solvant seul). Un échantillon est généralement considéré comme génotoxique si IF est supérieur ou égal à 2, modérément génotoxique si  $1,5 \leq \text{IF} < 2$  et non génotoxique si  $\text{IF} < 1,5$ .

### IV.9.2. Mesure de l'activité des extraits sédimentaires

Différents extraits sédimentaires ont été testés grâce au SOS Chromotest. Les résultats montrent qu'en absence d'activation par une fraction S9, des génotoxiques directs sont détectables sur les côtes françaises et britanniques (Fig. 82). De même, après bioactivation par une fraction S9, certains sites révèlent la présence de composés mutagènes indirects (Fig. 83).

L'ensemble des résultats sont reportés sur les cartes des côtes de la Manche (Fig. 84).

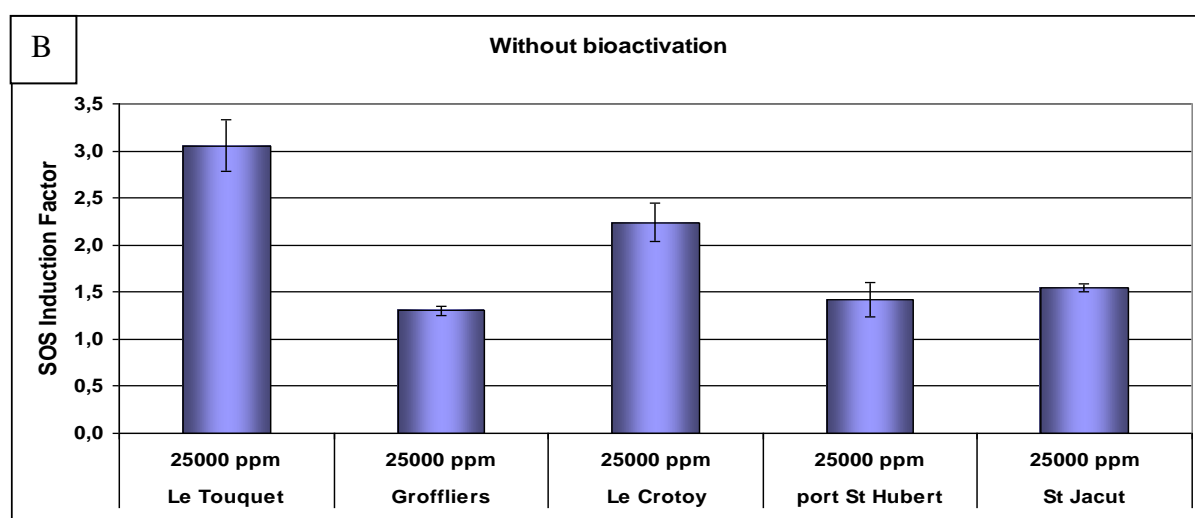
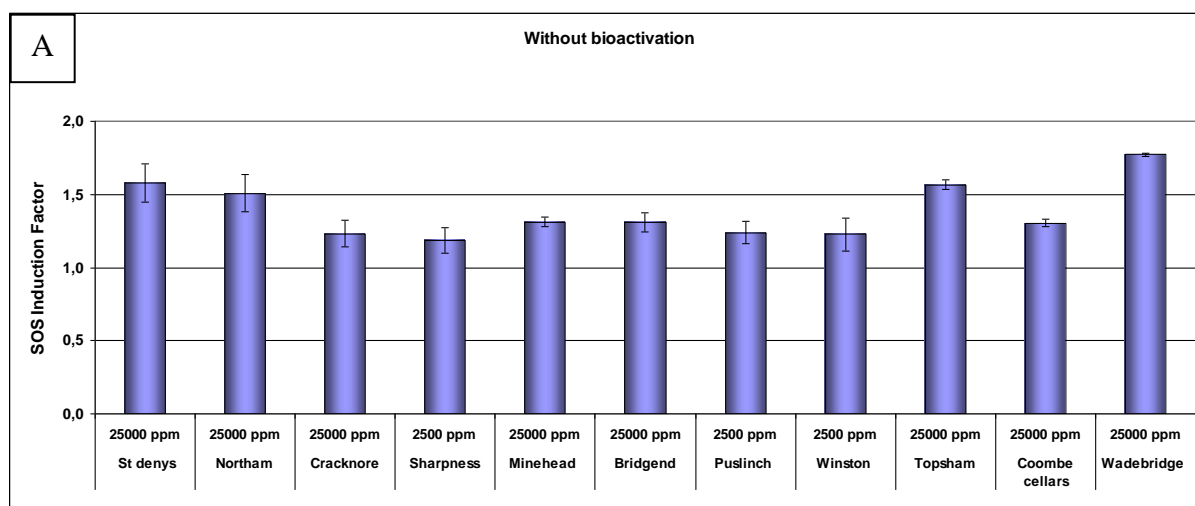


Figure 82 : Facteur d'induction du système SOS Chromotest d'extraits de sédiments des côtes britanniques (A) et françaises (B) en l'absence de bioactivation. Les extraits sont jugés significativement mutagènes lorsque le facteur d'induction est supérieur à 1,5.

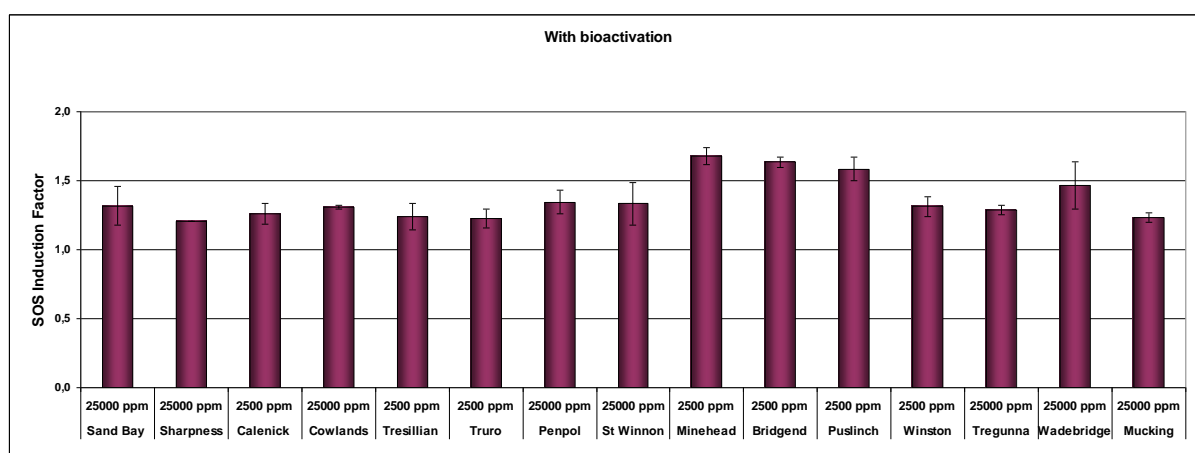


Figure 83 : Facteur d'induction du système SOS Chromotest d'extraits de sédiments des côtes britanniques après bioactivation par S9. Les extraits sont jugés significativement mutagènes lorsque le facteur d'induction est supérieur à 1,5.



Figure 84 : Cartographie des sites dont les extraits sédimentaires ont été analysés à l'aide du SOS Chromotest. Les points oranges, rouges et violets montrent la présence de composés mutagènes (dans l'ordre d'un facteur d'induction croissant) tandis que les sites marqués de points jaunes en sont absents.

## V. CONCLUSIONS

De précédents travaux menés par les partenaires du projet DIESE ont mis en évidence des dysfonctionnements et des effets délétères de la pollution sur la santé des organismes, touchant en particulier la reproduction ou le développement des poissons (Minier et al., 2000a et 2000b ; Martin-Skilton et al., 2006 ; Hinfrey et al., 2009 ; Minier et Amara, 2009, ) ou la reproduction des mollusques (Langston et al., 2007 ; Peck et al., 2007). Ces observations montrent que l'environnement aquatique, notamment dans les régions étudiées, contient des substances qui peuvent affecter les organismes et que le système de gestion de l'environnement ou les pratiques actuelles ne permettent pas de prévenir des effets importants dont les organismes sauvages sont les témoins. Ainsi les travaux menés au cours du programme de recherche DIESE ont eu pour objectifs d'identifier des composés à activité délétère pour les organismes, d'élucider des mécanismes d'action de xénobiotiques de l'environnement et de mettre en œuvre différents outils pour aider à la gestion des milieux aquatiques.

### *Identification de composés actifs à effets délétères pour les organismes*

La première partie de ce programme a permis de développer ou d'utiliser des outils biologiques existants afin d'identifier des composés présents dans l'environnement qui sont effectivement responsables des effets mesurés. Cette stratégie met en avant les effets biologiques qui permettent de guider la recherche des composés actifs. Bien qu'elle ne puisse prétendre à une identification exhaustive, cette stratégie permet de proposer une alternative à l'impossible mesure de tous les composés présents dans l'environnement. En effet, ceux-ci sont potentiellement très nombreux (près de 100 000) et il est probable que seule une partie d'entre eux ou un mélange de quelques composés soient responsables d'effets significatifs. L'identification de mécanisme d'action des polluants et l'utilisation de mesures liées à ces mécanismes permettent de mettre en relation les effets qu'il serait souhaitable d'éviter et la présence de perturbateurs dans les échantillons environnementaux.

Dans cette stratégie, le choix des effets biologiques mesurés est d'importance. Il est peu envisageable de mesurer tous les effets et seuls quelques mécanismes peuvent être mis en œuvre. Afin de diriger les recherches, des tests *in vitro* ont été utilisés ou développés. Il s'agit de tests cellulaires simples et rapides qui permettent une étude à haut débit des échantillons environnementaux. Les cibles qui ont fait l'objet des recherches dans DIESE sont des récepteurs aux stéroïdes sexuels. En effet ces récepteurs sont des nœuds de régulation très importants dans le système endocrinien et il a été montré que de nombreux perturbateurs endocriniens interagissent avec ces récepteurs (UNEP, 2012). Deux systèmes ont été utilisés : un test utilisant des levures génétiquement modifiées intégrant le récepteur humain aux androgènes et des explants de foie de gardons exprimant le récepteur aux œstrogènes. Le premier a permis d'identifier des composés à activité anti-androgénique dans les sédiments des côtes de la Manche tandis que le second a permis d'établir un nouveau système d'étude spécifique des poissons et d'étudier l'activité de composés œstrogéniques.

Il a été récemment suggéré que la féminisation observée chez les poissons sauvages est due à une combinaison de composés œstrogéniques et d'anti-androgènes (Jobling et al., 2009). Ainsi les chercheurs du programme DIESE ont mis au point un protocole d'extraction de composés des sédiments afin d'étudier la présence d'éventuelles molécules à activité anti-androgénique dans les échantillons environnementaux. Les résultats ont montré que de nombreux composés de la famille des hydrocarbures aromatiques sont susceptibles de perturber la physiologie des organismes en interagissant avec le récepteur aux androgènes. Six d'entre eux ont pu être formellement identifiés dans les extraits de sédiments. Il s'agit du benzanthrène, du fluoranthrène, du 1,2-benzodiphenylene sulfide, du benzo[a]pyrène, du benz[a]anthracène, et du 9-phenylcarbazole dont certains exercent des activités comparables au flutamide. A ces composés s'ajoutent des composés actifs très répandus tels que le triclosan et le chlorophène (Hill et al, 2010; Rostkowski et al, 2011).

La recherche de tels composés dans les tissus de scrobiculaires, mollusques présentant des dysfonctionnements de leur appareil reproducteur, a été menée. Elle a permis de détecter la présence



de composés anti-androgéniques dont l'identité est en cours d'analyse. Fait notable, une fraction androgène très active a aussi été découverte dans les tissus mâles. De la même façon les travaux se poursuivent pour en découvrir l'identité.

#### *Mise en évidence de mécanismes d'action de xénobiotiques de l'environnement*

Afin d'accroître les connaissances et notre compréhension d'éventuels dysfonctionnements dus à la présence de composés chimiques dans notre environnement, des études ont été entreprises sur les poissons et mollusques. Ces études ont été au cœur de la seconde partie du programme.

La recherche sur l'endocrinologie des mollusques pose un problème particulier car les connaissances sont encore très fragmentaires chez ces organismes. Afin de circonvier à cette difficulté et aussi d'étudier de façon la plus exhaustive possible la physiologie des mollusques, des démarches dites « ouvertes » impliquant des approches de métabolomique et de transcriptomique ont été entreprises. En effet, en absence de connaissances pointues, surveiller plusieurs milliers de paramètres simultanément permet d'identifier voies et mécanismes qui sont modifiées dans une situation particulière d'intérêt et ainsi d'orienter les études plus ciblées pour le développement d'outils.

L'approche métabolomique a été mise en œuvre sur les échantillons de moules exposées à différentes doses d'un stéroïde, l'œstradiol (E2). Environ 10 000 signaux ont été mesurés par spectrométrie de masse pour chaque échantillon et certains ont permis de parfaitement différencier les conditions d'exposition des moules. Parmi les signaux discriminants, certains ont pu être identifiés et permettent de développer des pistes d'étude et de proposer des mécanismes d'action des stéroïdes sur les mollusques. Ce fut le cas de prostaglandines et d'amines qui étaient différenciellement exprimées en présence et absence d'œstradiol et ont conduit à étudier certaines amines (5-HT) et les enzymes impliquées dans la synthèse des prostaglandines (COX). A partir de ces données, nous avons examiné les réponses du récepteur 5-HT et l'expression du gène COX dans les moules, *Mytilus edulis*, exposées à des composés œstrogéniques au cours des différentes étapes de leur cycle de reproduction. Les résultats ont permis de montrer que les niveaux d'expression des récepteurs 5-HT et des enzymes COX sont différents chez les mâles et les femelles, indiquant un rôle particulier selon le sexe et confirmant une implication des voies étudiées dans la régulation liée au sexe. De plus les résultats montrent que des concentrations écologiquement pertinentes de l'œstrogène naturel, E2, ainsi que de l'œstrogène synthétique, EE2, induisent des modifications, dans les niveaux d'expression des récepteurs 5-HT et / ou COX chez la moule. En particulier, E2 diminue le niveau d'expression des enzymes COX chez les femelles alors que le stéroïde est sans effet sur les bivalves mâles. Concernant l'expression du récepteur 5-HT, l'exposition à E2 entraîne une diminution de l'expression du gène chez les mâles et les femelles matures. A l'inverse, cette exposition en début de gamétogénèse engendre une augmentation très forte de l'expression du récepteur.

Ces résultats indiquent que des paramètres endocriniens importants pour la reproduction des mollusques peuvent être modifiés par l'exposition à des œstrogènes et permettent ainsi de proposer une première voie d'action des stéroïdes concernant les perturbations de la reproduction parfois observées en milieu naturel (Blaise et al., 2003 ; Gauthier-Clerc et al., 2006). La différence d'action selon le stade de développement sexuel est un résultat confirmant la difficulté d'appréhender les risques liés aux perturbateurs endocriniens puisque les effets ne dépendent pas seulement de la dose mais aussi de la fenêtre d'exposition.

Afin de poursuivre l'exploration de l'implication des stéroïdes dans la physiologie des mollusques, la technique d'hybridation différentielle de transcrits (SSH = suppressive hybridation soustraction) a été utilisée sur des échantillons de gonades moules à différents stades de la gamétogénèse et (en parallèle) après une exposition contrôlée à des œstrogènes. Cela a permis d'identifier plusieurs gènes régulés de façon différentielle, y compris un gène associé au récepteur des androgènes, une lysine de la vitelline et une séquence d'enveloppe vitelline. Ces séquences donnent une nouvelle orientation de recherche permettant de comprendre le rôle des hormones stéroïdes sexuelles dans les organismes invertébrés et offrent un moyen d'identification des perturbations endocriniennes chez ces organismes.

La technique de SSH a aussi été appliquée à la recherche et à la compréhension des perturbations du système reproducteur chez la scrobiculaire. Cet organisme est sujet à une différenciation inappropriée de certaines cellules des testicules conduisant à la formation d'ovocytes caractérisant les individus intersexués. Plusieurs transcrits d'ARNm intéressants ont été identifiés puis validés par amplification génique quantitative. Ces transcrits apparaissent réprimés dans les échantillons intersexués. Ils codent pour une variété de protéines impliquées dans la signalisation cellulaire (RACK1), le cycle cellulaire (PCNA, histone H3), la synthèse des protéines (protéines ribosomiques), le cytosquelette (tektin), la physiologie du sperme (tektin, SPL1) et le métabolisme énergétique (CYB, COX-1). Dans plusieurs cas, la réponse a été plus de 10 fois inférieure à celle des mâles témoins semblant indiquer que l'intersexualisation serait due, en particulier, à la répression de gènes masculinisant.

En lien avec l'intérêt pour les perturbations du système immunitaire pendant le développement, des études ont été conduites chez les juvéniles de bars afin de générer de nouvelles informations sur le développement du système immunitaire du bar, *D. labrax*, et d'étudier les effets d'une exposition à des composés œstrogéniques pendant le développement. Cette étude a permis en outre d'étudier les liens entre système immunitaire et système endocrinien. Les résultats ont permis de caractériser l'expression de récepteurs aux œstrogènes et de différentes cytokines au sein du rein antérieur, l'homologue de la moelle osseuse des mammifères et le lieu de l'hématopoïèse chez les téléostéens. Cet organe est particulièrement important dans le système immunitaire car il permet le développement et la prolifération des lymphocytes B. Il est également responsable du développement des capacités de phagocytose, de la reconnaissance des antigènes, de la formation d'immunoglobulines M et de la mémoire immunitaire par l'intermédiaire des centres mélanomacrophages qui sont les analogues primitives des ganglions lymphatiques (Rauta et al., 2012 ; Agius, 2003). Une période de maturation particulière, proche de 180 jours post-éclosion, a été identifiée. Elle semble correspondre à une somme d'événements cruciaux pour le développement du système immunitaire. Ainsi, nous avons pu observer les pics d'expression du récepteur  $\beta 2$  aux œstrogènes et de l'interleukine  $\beta -1$ , une migration importante de lymphocytes B hors du rein antérieur, ainsi qu'une hausse très sensible de l'activité macrophagique des populations leucocytaires du rein antérieur. Cette période, outre son importance évidente, pourrait être une fenêtre de sensibilité particulière du système immunitaire dont la perturbation pourrait entraîner des effets à long terme.

Les expériences répétées d'expositions de bars juvéniles à 20 ng/L d'œstradiol ont été conduites en conditions contrôlées au cours du développement du système immunitaire. Peu de modifications significatives ont été notées concernant les cytokines. Cependant des altérations manifestes de l'expression des récepteurs aux œstrogènes et une baisse significative de l'activité macrophagique ont été mesurées lors de la période critique identifiée précédemment, soulignant l'importance de cette période et ouvrant la voie à la manifestation d'effets qui pourraient compromettre le système immunitaire.

Afin de développer un outil permettant de mesurer d'éventuels effets androgéniques ou anti-androgéniques chez les poissons, le modèle chabot (*Cottus sp*) a été étudié. En effet, cette espèce présente un dimorphisme sexuel important au niveau du tissu rénal au cours de la période de reproduction qui pourrait être mis à profit. Cependant, bien que cette caractéristique androgéno-dépendante ait pu être confirmée et que son induction soit effectivement soumise à la présence d'androgènes actifs, sa mesure s'est révélée peu discriminante sur le terrain et de plus amples efforts sont nécessaires afin d'être en mesure de proposer un biomarqueur pertinent. Une piste explorée via l'utilisation de recherches protéomiques est actuellement poursuivie.

A l'inverse, les recherches menées sur le gardon, *Rutilus rutilus*, ont permis d'identifier de nouvelles altérations du système reproducteur des poissons. Alors que les précédentes études s'étaient attachées à étudier les perturbations du système endocrinien des mâles, cette étude a mis en œuvre un ensemble de mesures permettant d'explorer la physiologie des gardons femelles. Les résultats montrent que le développement des organes reproducteurs est compromis chez les gardons vivant dans les zones perturbées (en Seine dans le cas présent). Cela se traduit par une réduction de la masse relative des gonades accompagnée d'un retard de développement et d'une réduction de la synthèse et, par voie de conséquence, de l'accumulation de vitellogénine dans les ovocytes. Ainsi la quantité mais



aussi la qualité des ovocytes est altérée chez les gardons femelles exposées à une somme de composés chimiques. Il est notable que ces altérations semblent spécifiques du système reproducteur ou endocrinien car, par ailleurs, les gardons ne montrent aucune altération de croissance ou de poids et ne montrent aucun signe visible d'atteinte parasitaire. Enfin, afin d'explorer les mécanismes de cette altération, l'activité aromatasé gonadique a été étudiée et les résultats indiquent que cette activité est altérée chez les femelles de la Seine. Cette altération pourrait résulter de la sensibilité de l'aromatasé à de nombreux composés chimiques (Hinfrey et al., 2006) et contribuer à un déséquilibre hormonal préjudiciable à la reproduction des gardons.

Enfin, afin de documenter une suite de paramètres biologiques concernant les flets (*Platichthys flesus*) et d'étudier la capacité d'une suite de biomarqueurs à délivrer une image cohérente et informative de l'état de santé des poissons vivant sur nos côtes, des mesures de dommages à l'ADN, de réponses moléculaires et biochimiques, de réponses immunotoxicologiques, de profils isotopiques indicateurs du métabolisme énergétique, de croissance et de variabilité génétique ont été menées au cours d'expériences menées en laboratoire ou sur des populations naturelles de flet exposées à des contaminations contrastées en milieux estuariens.

L'exposition en laboratoire à un mélange complexe de PCB et d'HAP a engendré l'induction des systèmes de biotransformation et une réponse de quelques paramètres immunitaires mais pas de dommages à l'ADN. L'étude protéomique a montré la dérégulation du métabolisme énergétique, du métabolisme de la méthionine et du système de détoxification permettant d'identifier certains points de contrôles (les enzymes BHMT et SHMT) dans le mécanisme de perturbation. Les études sur les populations naturelles confirment l'altération du système immunitaire et du système endocrinien (en lien avec la vitellogénèse) en Seine sans conséquences notables sur les paramètres de croissance et l'indice de condition mais avec un impact fort sur la diversité génétique (hétérozygotie). Les mesures isotopiques soulignent l'importance des conditions environnementales dans la physiologie des poissons et en particulier les variabilités inter-estuariennes concernant la température, la présence de conditions hypoxiques et les stratégies de développement où les flets, selon les estuaires, alternent différemment les durées de vie entre milieu marin et eau douce. Ces mesures isotopiques apportent donc un éclairage particulier qui permet de mettre en perspective et de comprendre les situations et les conséquences des conditions naturelles sur les populations de flets.

Ainsi cette étude intégrative permet de montrer clairement que des mécanismes physiologiques sont affectés dans des environnements pollués et en particulier la Seine. Le métabolisme, le système immunitaire et le système endocrinien sont des cibles particulières qui peuvent être étudiés à l'aide de biomarqueurs sensibles et informatifs. De façon intéressante, les réponses des organismes et les altérations mesurées n'ont pas engendré de conséquences claires sur des mesures plus intégratives telles que la croissance mais semblent être associées à des modifications du patrimoine génétique et en particulier à une augmentation de la diversité qui pourrait favoriser la résistance des individus survivants.

#### *Mise en œuvre de différents outils pour aider à la gestion des milieux aquatiques*

Dans un troisième volet, les recherches menées dans le cadre du programme DIESE ont eu pour objectif de développer et de tester des méthodologies d'aide à la gestion de l'environnement. Deux voies d'études particulières ont été suivies. La première a consisté à déployer, sur tout ou partie de la région d'étude, des biomarqueurs robustes afin d'établir une cartographie susceptible de mettre en évidence les masses d'eaux à risque et de les mettre en relation avec les sources de ces perturbations. La seconde voie a permis d'explorer les méthodologies d'utilisation des biomarqueurs et leur intégration en un indice simple et clair.

Concernant le développement d'outils robustes, nous avons réalisé une analyse de la pertinence des mesures géniques utilisant les outils de biologie moléculaire et en particulier la PCR quantitative qui devient très usitée et de plus en plus largement répandue. Cette étude rigoureuse a permis de montrer que les quantifications pouvaient rapidement conduire à des interprétations erronées des résultats si certaines conditions n'étaient pas remplies, en particulier le choix d'un nombre suffisant de gènes de référence. La recommandation issue de l'analyse est de réaliser qu'une évaluation préliminaire de la stabilité génétique avant chaque quantification par qPCR et d'utiliser un

nombre suffisant (6 par exemple) de gènes contrôles pour garantir la fiabilité des résultats (Ciocan et al., 2011).

L'intégration des biomarqueurs dans une stratégie d'évaluation de la qualité de l'environnement est un enjeu fort. Cette stratégie n'a pas encore de rôle défini dans la réglementation européenne or elle est susceptible d'apporter des informations pertinentes sur des paramètres tels que le métabolisme, la reproduction ou l'immunité qui sont des mécanismes ou physiologies clés dont la perturbation entraîne des dysfonctionnements de nombreux organismes incluant l'homme. Ils sont ainsi capables de donner une signification biologique à la présence de contaminants de l'environnement et d'intégrer une somme de facteurs pour construire une image cohérente des pressions.

Une étude intégrative a été menée sur des juvéniles de flets à la fois par des études de laboratoire et de terrain. Elle a permis de mettre en œuvre une suite de biomarqueurs tant moléculaires que physiologiques ou biométriques. Cette étude a mis en évidence l'intérêt de disposer des marqueurs de différents niveaux de l'organisation biologique. Ces indicateurs peuvent en effet être complémentaires ou au contraire donner une image légèrement ambivalente qui est parfois le propre des réactions biologiques. Elle montre que certains biomarqueurs biochimiques, notamment liés au métabolisme ne sont pas univoques et sont des outils dont la variabilité nécessite l'utilisation d'une suite de marqueurs. Les réponses des biomarqueurs physiologiques apparaissent plus prédictives des effets délétères des contaminants chimiques. L'utilisation de biomarqueurs à forte pertinence écologique apparaît ainsi essentielle pour évaluer les effets des contaminants chimiques sur la santé des organismes et *a fortiori* des populations. Au travers des études de terrain et de laboratoire, les paramètres de croissance, l'indice de condition K de Fulton, le rapport ARN/ADN et l'indice lipidique (TAG/ST) ont été utilisés avec succès pour évaluer les effets des contaminants chimiques sur les juvéniles de poisson. Ils informent indirectement sur les coûts énergétiques induits par les contaminants chimiques et directement sur la croissance et l'état de santé de l'individu exposé (Adams et al., 1990). Ils peuvent ainsi refléter les probabilités de survie de l'organisme. Ces indices biologiques présentent l'avantage d'être relativement facile à mesurer et offrent des informations pertinentes sur l'état de santé du poisson. De plus, cette étude démontre la potentialité de l'utilisation des juvéniles de poisson dans les études écotoxicologiques car leurs performances physiologiques sont plus élevées que celles des plus organismes plus âgés, probablement du fait de leur différence d'état métabolique.

L'intégration de multiple biomarqueurs au sein d'un indice permettant de globaliser de façon simple et claire les réponses biologiques a été poursuivie dans le programme DIESE. L'indice biomarqueur (IBI) développé est basé sur l'IBR (Integrated Biological Responses) développé par Beliaeff et Burgeot (2002). Les travaux montrent qu'il est nécessaire de parfaitement caractériser les réponses biologiques afin d'en connaître les variations naturelles et ainsi d'en dégager les modifications indicatrices de perturbations. L'outil développé a permis d'intégrer des variations négatives et positives et d'en dégager une représentation graphique permettant d'identifier aisément les problèmes mis en lumière par les biomarqueurs. L'outil est évolutif et pourra bénéficier des apports, notamment des travaux menés dans DIESE, pour intégrer de nouveaux biomarqueurs et donc affiner les informations apportées par l'indice.

Certains biomarqueurs apportent, par eux-mêmes, une information sur les conséquences dont elles sont le système d'alerte. C'est ainsi que certaines mesures biologiques ont pu être mises en œuvre au cours du programme DIESE afin de cartographier et ainsi apporter une information sur l'état de l'environnement et des organismes. Ainsi des cartes partielles ou totales de l'espace Manche ont été produites afin de rapporter la présence de composés mutagènes ou anti-androgènes dans les sédiments des côtes françaises et britanniques. De même une cartographie de modifications profondes de la physiologie de la reproduction des poissons et des mollusques a été dressée. Les modifications chez les gardons et les scrobiculaires sont identifiées par la présence de mâles intersexués, et par le phénomène d'imposex chez les nuelles. Ces cartographies restent parfois à compléter et un travail nécessaire consistera à confronter ces informations afin d'en dégager des enseignements pertinents pour la gestion de l'environnement, un objectif auquel le programme DIESE aura contribué en apportant certaines informations nécessaires et originales.

## V. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Adams S.M., Shugart, L.R., Southworth, G.R., Hinton, D.E., 1990. Application of bioindicators in assessing the health of fish populations experiencing contaminant stress. In: McCarthy, J.F., Shugart, L.R. (Eds.), *Biomarkers of Environmental Contamination*. Lewis Publishers, Boca Raton, pp. 333–353 (Chapter 19).
- Adams SB, Schmetterling DA. 2007. Freshwater sculpins: Phylogenetics to ecology. *Transactions of the American Fisheries Society* 136 (6):1736-1741.
- Akcha F., Vincent F., Hubert Pfol-Leszkowicz A. 2003. «Potential value of the comet assay and DNA adduct measurement in dab (*Limanda limanda*) for assessment of in situ exposure to genotoxic compounds». *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, vol. 534, no 1–2, p. 21-32.
- Allen Y, Scott AP, Matthiessen P, Haworth S, Thain JE, Feist S. 1999. Survey of estrogenic activity in United Kingdom estuarine and coastal waters and its effects on gonadal development of the flounder *Platichthys flesus*. *Environmental Toxicology and Chemistry* 18 (8):1791-1800.
- Alquezar R., Markich, S.J., Booth, D.J. 2006. Effects of metals on condition and reproductive output of the smooth toadfish in Sydney estuaries, south-eastern Australia. *Environmental Pollution* 142, 116–122.
- Al-Yakoob S.M., Gundersen, D., Curtis, L. 1996. Effects of the Water-Soluble Fraction of Partially Combusted Crude Oil from Kuwait's Oil Fires (from Desert Storm) on Survival and Growth of the Marine Fish *Menidia beryllina*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 35, 142–149.
- Amara R., Meziane T., Gilliers C., Hermel G., Laffargue P. 2007. Growth and condition indices in juvenile sole *Solea solea* measured to assess the quality of essential fish habitat. *Marine Ecology Progress Series* 351:201-208. doi:10.3354/meps07154.
- Amara R., Selleslagh J., Billen G., Minier C. 2009. Growth and condition of 0-group European flounder, *Platichthys flesus* as indicator of estuarine habitat quality. *Hydrobiologia* 627(1):87-98.
- Arukwe A., Goksøyr A. 1998. Xenobiotics, xenoestrogens and reproduction disturbances in fish. *Sarsia* 83 (3):225-241.
- Arukwe A., Goksøyr A. 2003. Eggshell and egg yolk proteins in fish: hepatic proteins for the next generation: oogenetic, population, and evolutionary implications of endocrine disruption. *comparative hepatology* 2:1-21.
- Arukwe A., Knudsen F.R., Goksøyr A. 1997. Fish zona radiata (eggshell) protein: a sensitive biomarker for environmental estrogens. *Environmental Health Perspectives* 105(4):418-418.
- Babo S., Vasseur P. 1992. In vitro effects of thiram on liver antioxidant enzyme activities of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquatic Toxicology* 22, 61–68.
- Batty J, Lim R. 1999. Morphological and Reproductive Characteristics of Male Mosquitofish (*Gambusia affinis holbrooki*) Inhabiting Sewage-Contaminated Waters in New South Wales, Australia. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 36 (3):301-307.
- Baumard P., Budzinski H., Garrigues P. 1997. Analytical procedure for the analysis of PAHs in biological tissues: application to mussels. *Fresenius Z. Analytical Chemistry* 359, 502–509.
- Beck M.W., Heck K., Able K., Childers D., Egglestone D., Gillanders B., Halpern B., Hays C., Hoshino K., Minello T., Orth R., Sheridan P., Weintin M. 2001. The identification, conservation and management of estuarine and marine nurseries for fish and invertebrates. *Bioscience* 51, 633–641.
- Beeby A. 2001. What do sentinels stand for? *Environmental Pollution* 112 (2):285-298.
- Bessho H, Iwakami S, Hiramatsu N, Hara A, Hashimoto S. 2000. Development of a sensitive luminometric immunoassay for determining baseline seasonal changes in serum vitellogenin levels in male flounder (*Pleuronectes yokohamae*). *International Journal of Environmental Analytical Chemistry* 76 (3):155-166.
- Beyers D., Rice J., Clements W., Henry C. 1999. «Estimating physiological cost of chemical exposure: integrating energetics and stress to quantify toxic effects in fish». *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, vol. 56, p. 814-822.
- Bilbao E., Raingeard D., Diaz de Cerio O., Ortiz-Zarragoitia M., Ruiz P., Izagirre U., Orbea A., Marigomez I., Cajaraville M.P., Cancio I. 2010. Effects of exposure to Prestige-like heavy fuel oil and to perfluorooctane sulfonate on conventional biomarkers and target gene transcription in the thicklip grey mullet *Chelon labrosus*. *Aquatic Toxicology* 98, 282–296.
- Billen G., Garnier J., Ficht A., Cun C. 2001. Modeling the response of water quality in the Seine River estuary to human activity in its watershed over the last 50 years. *Estuaries*, 24(6):977-993.
- Binder-Foucard F, Belot A, Delafosse P, Remontet L, Woronoff A-S, Bossard N. 2013. Estimation nationale de l'incidence et de la mortalité par cancer en France entre 1980 et 2012. Partie 1 - Tumeurs solides. Saint-Maurice (Fra) : Institut de veille sanitaire. 122 p.

- Birchenough, A.C., Evans, S.M., Moss, C. & Welch, R. 2002 Re-colonisation and recovery of populations of dogwhelks *Nucella lapillus* (L.) on shores formerly subject to severe TBT contamination. *Marine Pollution Bulletin*. 44 (7); 652-659.
- Bjerregaard LB, Korsgaard B, Bjerregaard P. 2006. Intersex in wild roach (*Rutilus rutilus*) from Danish sewage effluent-receiving streams. *Ecotox Environ Safe* 64 (3):321-328.
- Bjorkblom C, Hogfors E, Salste L, Bergelin E, Olsson PE, Katsiadaki I, Wiklund T. 2009. Estrogenic and Androgenic Effects of Municipal Wastewater Effluent on Reproductive Endpoint Biomarkers in Three-Spined Stickleback (*Gasterosteus aculeatus*). *Environmental Toxicology and Chemistry* 28 (5):1063-1071.
- Blaise C., Gagné F., Salazar M., Salazar S., Trottier S., Hansen P.D. 2003. Experimentally-induced feminisation of freshwater mussels after long-term exposure to a municipal effluent. *Fresenius Environ. Bull.* 12, 8.
- Blanchard, M., Teil, M.J., Carru, A.M., Chesterikoff, A., Chevreuil, M. 1997. Organochlorine distribution and mono-orthosubstituted PCB pattern in the roach (*Rutilus rutilus*) from the river Seine. *Water Res*, 31:1455-1461.
- Bligh, E.G., Dyer, W.J. 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, 37, 911-917.
- Bols, N.C., J.L. Brubacher, R.C. Ganassin et L.E.J. Lee. 2001. «Ecotoxicology and innate immunity in fish». *Developmental & Comparative Immunology*, vol. 25, no 8-9, p. 853-873.
- Bon E, Barbe U, Rodriguez JN, Cuisset B, Pelissero C, Sumpster JP, LeMenn F. 1997. Plasma vitellogenin levels during the annual reproductive cycle of the female rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): Establishment and validation of an ELISA. *Comparative Biochemistry and Physiology B-Biochemistry & Molecular Biology* 117 (1):75-84.
- Borg B. 1993. Effectiveness of several androgens in stimulating kidney hypertrophy, a secondary sexual character, in castrated male three-spined sticklebacks, *Gasterosteus aculeatus*. *Can J Zool*: 2327-2329.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of protein utilising the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72, 248-254.
- Bray, S., Herbert, R.J.H. 1998. A reassessment of populations of the dog-whelk (*Nucella lapillus*) on the Isle of Wight following legislation restricting the use of TBT antifouling paints. *Proceedings of the Isle of Wight Natural History and Archaeological Society*. 14; 23-40.
- Brion F, Nilsen BM, Eidem JK, Goksoyr A, Porcher JM. 2002. Development and validation of an enzyme-linked immunosorbent assay to measure vitellogenin in the zebrafish (*Danio rerio*). *Environmental Toxicology and Chemistry* 21 (8):1699-1708.
- Brion F, Rogerieux F, Noury P, Migeon B, Flammarion P, Thybaud E, Porcher JM. 2000. Two-step purification method of vitellogenin from three teleost fish species: rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), gudgeon (*Gobio gobio*) and chub (*Leuciscus cephalus*). *Journal of Chromatography B* 737 (1-2):3-12.
- Bryan, G.W. Gibbs. P.E., Burt, G.R. and Hummerstone, L.G. 1986. The decline of the gastropod *Nucella lapillus* around South-West England: evidence for the effects of tributyltin from anti-fouling paints. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 66:611-640
- Bucher F, Hofer R, Krumschnabel G, Doblander C. 1993. Disturbances in the Prooxidant - Antioxidant Balance in the Liver of Bullhead (*Cottus-gobio* L) Exposed to Treated Paper-Mill Effluents. *Chemosphere* 27 (8):1329-1338.
- Bucher F, Hofer R, Salvenmoser W. 1992. Effects of Treated Paper-Mill Effluents on Hepatic Morphology in Male Bullhead (*Cottus-gobio* L). *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 23 (4):410-419.
- Bucher F, Hofer R. 1993. Histological and Enzyme Histochemical-Changes in the Kidney of Male Bullhead (*Cottus Gobio*) During the Spawning Period. *Journal of Fish Biology* 42 (3):403-409.
- Buckley L., Caldarone E., Ong T.L. 1999. RNA-DNA ratio and other nucleic acid-based indicators for growth and condition of marine fishes. *Hydrobiologia* 401, 265-277.
- Budzinski H., Jones I., Bellocq J., Piérard C., Garrigues P. 1998. Evaluation of the sediment contamination by PAHs in the Gironde estuary. *Mar. Chem.*, 58: 85-97.
- Budzinski H., Mazeas O., Tronczynski J., Desaunay Y., Bocquene Claireaux G. 2004. Link between exposure of fish (*Solea solea*) to PAHs and metabolites: application to the “Erika” oil spill. *Aquatic Living Resources* 17, 329-334.
- Bugel S.M., White L.A., Cooper K.R. 2010. Impaired reproductive health of killifish (*Fundulus heteroclitus*) inhabiting Newark Bay NJ, a chronically contaminated estuary. *Aquat Toxicol*, 96 (3):182-193.
- Cachot J., Geffard O., Augagneur S., Lacroix S., Le Menach K., Peluhet L., et al., 2006. Evidence of genotoxicity related to high PAH content of sediments in the upper part of the Seine estuary (Normandy, France). *Aquatic Toxicol.* 79 : 257-267.
- Caporal-Gautier J, Nivet JM AP, Guilloteau M, Histe M, M. L. 1992b. Guide de validation analytique. Rapport d’une commission SFSTP. I. Méthodologie. *STP Pharma Pratiques* 2:205-226.

- Caporal-Gautier J, Nivet JM, Algranti P, Guilloteau M, Histe M, M. L. 1992a. Guide de validation analytique. Rapport d'une commission SFSTP. II. Exemples d'application. . STP Pharma Pratiques 2:227-239.
- Castro B.B., Sobral O. Guilhermino L., Ribeiro R. 2004. An In Situ Bioassay Integrating Individual and Biochemical Responses Using Small Fish Species. *Ecotoxicology* 13, 667–681.
- CCME. 1999. Canadian sediment quality guidelines for the protection of aquatic life: Summary tables. In: Canadian environmental quality guidelines, 1999, Canadian Council of Ministers for the Environment, Winnipeg.
- Chesman, B. S.; Langston, W. J., Intersex in the clam *Scrobicularia plana*: a sign of endocrine disruption in estuaries? *Biol*
- Christiansen LB, Pedersen KL, Pedersen SN, Korsgaard B, Bjerregaard P. 2000. In vivo comparison of xenoestrogens using rainbow trout vitellogenin induction as a screening system. *Environmental Toxicology and Chemistry* 19 (7):1867-1874.
- Claireaux, G., Désaunay, Y., Akca, F., Aupérin, B., Bocquené, G., Budzinski, H., Cravedi, J.P., Davoodi, F., Galois, R., Gilliers, C., Goanvec, C., Guérault, D., Imbert, N., Mazéas, O., Nonotte, G., Nonotte, L., Prunet, P., Sébert P., Vettier, A. 2004. Influence of oil exposure on the physiology and ecology of the common sole *Solea solea*: experimental and field approaches. *Aquatic Living Resources* 17, 335–351.
- Clemmesen C.M. 1988. A RNA and DNA fluorescence technique to evaluate the nutritional condition of individual marine fish larvae. *Meeresforschung, Reports on Marine Research* 32, 134–143.
- Colborn T, Saal FSV, Soto AM. 1993. Developmental Effects of Endocrine-Disrupting Chemicals in Wildlife and Humans. *Environmental Health Perspectives* 101 (5):378- 384.
- Collier T.K., Krone C.A., Krahn M.G., Stain J.E., Chan S.L., Varanasi U. 1996. Petroleum exposure and associated biochemical effects in subtidal fish after the Exxon valdez oil spill. *American Fisheries Society Symposium* 18, 671–683.
- Colson, I. and Hughes, R.N. 2004. Rapid recovery of genetic diversity of dogwhelk (*Nucella lapillus* L.) populations after local extinction and recolonisation contradicts predictions from life history characteristics. *Molecular Ecology*. 13; 2223-2233.
- Cravatt B. F., Simon G. M., Yates J. R. 2007. The biological impact of mass-spectrometry-based proteomics. *Nature* 450(7172):991-1000.
- De Wit, M., D. Keil, N. Remmerie, K. Van der Ven, E. J. Van den Brandhof, D. Knapen, E. Witters & W. De Coen, 2008. Molecular targets of TBBPA in zebrafish analysed through integration of genomic and proteomic approaches. *Chemosphere* 74(1):96–105.
- DeFranco, A.L., M. Robertson et R.M. Locksley. 2009. *Immunité : la réponse immunitaire dans les maladies infectieuses et inflammatoires*. Bruxelles.
- Defur, P., Crane, M., Ingersoll, C. & Tattersfield, L. 1999. *Endocrine Disruption in Invertebrates: Endocrinology, Testing and Assessment*. Pensacola, FL.
- Delgado, M. & Camacho, A. P. 2002; Hermaphroditism in *Ruditapes decussatus* (L.)(Bivalvia) from the Galician coast (Spain). *Scientia Marina* 66, 183-185.
- Déniel, C. 1981. «Les Poissons plats (Téléostéens, Pleuronectiformes) en baie de Douarnenez: reproduction, croissance et migration des *Bothidae*, *Scophthalmidae*, *Pleuronectidae* et *Soleidae*». Université de Bretagne Occidentale.
- Depledge, M.H., Aagaard, A., Gyorkos, P., 1995. Assessment of trace metal toxicity using molecular, physiological and behavioural biomarkers. *Marine Pollution Bulletin* 31 (1-3), 19–27.
- Dorts J, Kestemont P, Dieu M, Raes M, Silvestre F. 2011a. Proteomic Response to Sublethal Cadmium Exposure in a Sentinel Fish Species, *Cottus gobio*. *Journal of Proteome Research* 10 (2):470-478.
- Dorts J, Kestemont P, Marchand P-A, D'Hollander W, Thezenas M-L, Raes M, Silvestre F. 2011b. Ecotoxicoproteomics in gills of the sentinel fish species, *Cottus gobio*, exposed to perfluorooctane sulfonate (PFOS). *Aquatic Toxicology* 103 (1-2):1-8.
- Driedger K., Weber L.P., Rickwood C.J., Dube M.G., Janz D.M. 2010. Growth and energy storage in juvenile fathead minnows exposed to metal mine waste water in simulated winter and summer conditions. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 73, 727–734.
- Dufour E, Gerdeaux D, Wurster CM. 2007. Whitefish (*Coregonus lavaretus*) respiration rate governs intra-otolith variation of  $\delta^{13}\text{C}$  values in Lake Annecy. *Canadian Journal of Fisheries Aquatic Sciences*, **64**, 1736-1746.
- Dunier M. 1996. «effets des pesticides et des métaux lourds sur le système immunitaire de la carpe *Cyprinus carpio*». *Ichthyophysiol.*, vol. Acta 14, p. 9-22.
- Dunier M. et A.K. Siwicki. 1993. Effects of pesticides and other organic pollutants in the aquatic environment on immunity of fish - a review. *Fish & Shellfish Immunology*, vol. 3, no 6, Nov, p. 423-438.
- Evans, S.M., Evans, P.M. & Leksono, T. 1996. Widespread recovery of dogwhelks, *Nucella lapillus* (L.), from tributyltin contamination in the North Sea and Clyde Sea *Mar.Poll.Bull.*, 32, 263-369.

- Evans, S.M., Hawkins, S.T., Porter, J. & Samosir, A.M. 1994. Recovery of dogwhelk populations on the Isle of Cumbrae, Scotland, following legislation limiting the use of TBT as an antifoulant. *Mar.Poll.Bull.* 28(1): 15-17.
- Evans, S.M., Kerrigan, E. & Palmer, N. 2000. Causes of imposex in the dogwhelk *Nucella lapillus* (L.) and its use as a biological indicator of tributyltin contamination. *Mar.Poll.Bull.* 40:212-219.
- Evans, S.M., Leksono, T. & McKinnell, P.D. 1995. Tributyltin pollution: a diminishing problem following legislation limiting the use of TBT-based anti-fouling paints. *Mar.Poll.Bull.* 30(1): 14-21.
- Evrard E. 2009. «Réponses d'un poisson estuarien le flet (*Platichthys flesus*) au stress pesticides en milieu expérimental et au multi-stress in situ». Université de Bretagne Occidentale, 189 p.
- Evrard E., A. Devaux, S. Bony, J. Cachot, G. Charrier, L. Quiniou et J. Laroche. 2012. Responses of juvenile European flounder (*Platichthys flesus*) to multistress in the Vilaine estuary, during a 6-month survey. *Environmental Science and Pollution Research*, p. 1-14.
- Evrard E., A. Devaux, S. Bony, T. Burgeot, R. Riso, H. Budzinski, M. Du, L. Quiniou et J. Laroche. 2010a. Responses of the European flounder *Platichthys flesus* to the chemical stress in estuaries: load of contaminants, gene expression, cellular impact and growth rate. *Biomarkers*, vol. 15, no 2, p. 111-127.
- Evrard E., Marchand J., Theron M., Pichavant-Rafini K., Durand G., Quiniou L., Laroche J. 2010b. Impacts of mixtures of herbicides on molecular and physiological responses of the European flounder *Platichthys flesus*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, vol. 152, no 3, p. 321-331.
- Faller P, Kobler B, Peter A, Sumpter JP, Burkhardt-Holm P. 2003. Stress status of gudgeon (*Gobio gobio*) from rivers in Switzerland with and without input of sewage treatment plant effluent. *Environmental Toxicology and Chemistry* 22 (9):2063-2072.
- Flammarion P, Brion F, Babut M, Garric J, Migeon B, Noury P, Thybaud E, Tyler CR, Palazzi X, Tyler CR. 2000. Induction of fish vitellogenin and alterations in testicular structure: Preliminary results of estrogenic effects in chub (*Leuciscus cephalus*). *Ecotoxicology* 9 (1-2):127-135.
- Flammarion P., Garric J. 1997. Cyprinids EROD activities in low contaminated rivers: a relevant statistical approach to estimate reference levels for EROD biomarker. *Chemosphere* 35, 2375-2388.
- Fonseca V., Serafim, A., Compagny, R., Bebianno, M.J., Cabral, H. 2009. Effect of copper exposure on growth, condition indices and biomarker response in juvenile sole *Solea senegalensis*. *Scientia Marina* 73, 51–58.
- França S., M.J. Costa & H.N. Cabral. 2011. Inter- and intra-estuarine fish assemblage variability patterns along the Portuguese coast. *Estuarine Coastal and Shelf Science* 91: 262-271.
- Freyhof J, Kottelat M, Nolte A. 2005. Taxonomic diversity of European Cottus with description of eight new species (Teleostei: Cottidae). *Ichthyological Exploration of Freshwaters* 16 (2):107-172.
- Fukada H, Haga A, Fujita T, Hiramatsu N, Sullivan CV, Hara A. 2001. Development and validation of chemiluminescent immunoassay for vitellogenin in five salmonid species. *Comparative Biochemistry and Physiology a-Molecular and Integrative Physiology* 130 (1):163-170.
- Fulton T.W., 1904. The rate of growth of fishes. Fisheries Board of Scotland, Annual Report 22 part 3, 141–241.
- García-Mayor R.V., Vidal A.L., Docet Caamaño M.F., Giménez A.L. 2012. Endocrine disruptors and obesity: Obesogens. *Endocrinol Nutr.* 59(4): 261-267.
- Gauthier-Clerc S., Pellerin J., Amiard J.C. 2006. Estradiol-17 $\beta$  and testosterone concentrations in male and female *Mya arenaria* (Mollusca bivalvia) during the reproductive cycle. *Gen. Comp. Endocrinol.* 145, 133–139.
- Geraudie P, Gerbrón M, Hill E, Minier C. 2010a. Roach (*Rutilus rutilus*) reproductive cycle: a study of biochemical and histological parameters in a low contaminated site. *Fish Physiology and Biochemistry* 36 (3):767-777.
- Geraudie P., Boulange-Lecomte C., Gerbrón, M., Hinfray, N., Brion, F., Minier, C. 2010b. Endocrine effects of the tapeworm *Ligula intestinalis* in its teleost host, the roach (*Rutilus rutilus*). *Parasitology*, 137(4):697-704.
- Geraudie P., Hinfray N., Gerbrón M., Porcher J.M., Brion F., Minier C. 2011. Brain cytochrome P450 aromatase activity in roach (*Rutilus rutilus*): seasonal variations and impact of environmental contaminants. *Aquat Toxicol.* 105(3-4):378-84.
- Gercken J, Sordyl H. 2002. Intersex in feral marine and freshwater fish from northeastern Germany. *Marine Environmental Research* 54 (35):651-655. Gosselin MP, Petts GE, Maddock IP (2010) Mesohabitat use by bullhead (*Cottus gobio*). *Hydrobiologia* 652 (1):299-310.
- Gibbs, P.E., Bryan, G.W., Pascoe, P.L. and Burt, G.R. 1987. The use of the dog-whelk, *Nucella lapillus*, as an indicator of tributyltin (TBT) contamination. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 67, 507-523.
- Gibbs, P.E., Green, J.C. and Pascoe, P.L. 1999. A massive summer kill of the dog-whelk, *Nucella lapillus*, on the north Cornwall coast in the summer of 1995: freak or forerunner?. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 79(1), 103-109

- Gibson M.R. 1994. Population dynamics of winter flounder in Mt. Hope Bay in relations to operations at the Brayton Point Electric Plant. RI Division Fish and Wildlife. Report to the Brayton Point Technical Advisory Committee, May 1992. Revised December 1993.
- Gibson R.N. 2005. Flatfishes. Biology and Exploitation. Blackwell Publishing, Oxford pp. 1–391.
- Gravato C., Santos, M.A. 2003. *Dicentrarchus labrax* biotransformation and genotoxicity responses after exposure to a secondary treated industrial/urban effluent. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 55, 300–306.
- Gray MA, Niimi AJ, Metcalfe CD. 1999. Factors affecting the development of testis-ova in medaka, *Oryzias latipes*, exposed to octylphenol. *Environmental Toxicology and Chemistry* 18 (8):1835-1842.
- Grosbois C., Meybeck M., Horowitz, A., Ficht, A., 2006. Spatio-temporal distribution of Cd, Cu, Hg, Pb and Zn (1984-2000) in the Seine river particulate matter. *Sci. Tot. Env.* 356(1-3):22-37.
- Guérit I., Bocquené G., James A., Thybaud E., Minier C. 2008. Environmental risk assessment: a critical approach of the European TGD in an in situ application. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 71: 291-300.
- Habig W.H., Pabst M.J., Jakoby W.B. 1974. Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *Journal of Biology and Chemistry* 249, 7130–7139.
- Hagger J.A., M.B. Jones, D. Lowe, D.R.P. Leonard, R. Owen et T.S. Galloway. 2008. Application of biomarkers for improving risk assessments of chemicals under the Water Framework Directive: A case study. *Marine Pollution Bulletin*, vol. 56, no 6, p. 1111-1118.
- Head J.A., Dolinoy D C., Basu N. 2012. Epigenetics for ecotoxicologists. *Environmental toxicology and chemistry / SETAC* 31(2):221-7 doi:10.1002/etc.1707.
- Hecker M, Tyler CR, Hoffmann Me, Maddix S, Karbe L. 2002. Plasma Biomarkers in Fish Provide Evidence for Endocrine Modulation in the Elbe River, Germany. *Environmental Science & Technology* 36 (11):2311-2321.
- Hentschel H (1982) Histochemical-Observations on Glycoproteins in the Urinary Apparatus of the Bullhead *Cottus gobio* L and the Bull Rout *Myoxocephalus scorpius* (L). *Zeitschrift Fur Mikroskopisch-Anatomische Forschung* 96 (1):171-179.
- Hill, E. M.; Evans, K. L.; Horwood, J.; Rostkowski, P.; Oladapo, F. O.; Gibson, R.; Shears, J. A.; Tyler, C. R., Profiles and Some Initial Identifications of (Anti)Androgenic Compounds in Fish Exposed to Wastewater Treatment Works Effluents. *Environ. Sci. Technol.* 2010, 44, (3), 1137-1143.
- Hinfray N, Palluel O, Piccini B, Sanchez W, Ait-Aissa S, Noury P, Gomez E, Geraudie P, Minier C, Brion F, Porcher JM. 2010. Endocrine disruption in wild populations of chub (*Leuciscus cephalus*) in contaminated French streams. *Science of the Total Environment* 408 (9):2146-2154.
- Hinfray N., Porcher J.-M., Brion F. 2006. Inhibition of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) P450 aromatase activities in brain and ovarian microsomes by various environmental substances. *Comp. Biochem. Physiol., C.* 144:252–262.
- Holland M.C.H. et J.D. Lambris. 2002. The complement system in teleosts. *Fish & Shellfish Immunology*, vol. 12, no 5, p. 399-420.
- Horowitz A. J.; Meybeck, M.; Idlafkih, Z.; Biger, E., 1999. Variations in trace element geochemistry in the Seine River Basin based on floodplain deposits and bed sediments. *Hydrol Process*, 13:1329-1340.
- Huet M., Y. M. Paulet & J. Clavier. 2004. Impossex in *Nucella lapillus*: a ten year survey in NW Brittany. *Mar Ecol Prog Ser.* 270: 153–161.
- Hughes, R. 1971. Reproduction of *Scrobicularia plana* Da Costa (Pelecypoda: Semelidae) in North Wales. *Veliger*. 14, 77-81.
- Hurter E, Pool EJ, Van Wyk JH. 2002. Validation of an *ex vivo* *Xenopus* liver slice bioassay for environmental estrogens and estrogen mimics. *Ecotoxicol Environ Saf* 53(1):178-187.
- Janer, G.; Bachmann, J.; Oehlmann, J.; Schulte-Oehlmann, U.; Porte, C., The effect of organotin compounds on gender specific androstenedione metabolism in the freshwater ramshorn snail *Marisa cornuarietis*. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 2006, 99, (2-3), 147-156.
- Jobling S, Beresford N, Nolan M, Rodgers-Gray T, Brighty GC, Sumpter JP, Tyler CR. 2002. Altered sexual maturation and gamete production in wild roach (*Rutilus rutilus*) living in rivers that receive treated sewage effluents. *Biology of Reproduction* 66 (2):272-281.
- Jobling S, Nolan M, Tyler CR, Brighty G, Sumpter JP. 1998. Widespread sexual disruption in wild fish. *Environmental Science & Technology* 32 (17):2498-2506. Jobling S, Tyler CR (2003) Endocrine disruption in wild freshwater fish. *Pure and Applied Chemistry* 75 (11-12):2219-2234.
- Jobling S., Tyler C. R. 2003. Endocrine disruption in wild freshwater fish. *Pure Appl Chem*, 75(11-12):2219-2234.
- Jobling, S.; Burn, R. W.; Thorpe, K.; Williams, R.; Tyler, C., Statistical Modeling Suggests that Antiandrogens in Effluents from Wastewater Treatment Works Contribute to Widespread Sexual Disruption in Fish Living in English Rivers. *Environ. Health Perspect.* 2009, 117, (5), 797-802.

- Jobling, S.; Williams, R.; Johnson, A.; Taylor, A.; Gross-Sorokin, M.; Nolan, M.; Tyler, C. R.; van Aerle, R.; Santos, E.; Brighty, G., Predicted exposures to steroid estrogens in UK rivers correlate with widespread sexual disruption in wild fish populations. *Environ. Health Perspect.* 2006, *114*, 32-39.
- Johnson L.L., Lomax D.P., Myers M.S., Olson O.P., Sol S.Y., O'Neill S.M., West J., Collier T.K. 2008. Xenoestrogen exposure and effects in English sole (*Parophrys vetulus*) from Puget Sound, WA. *Aquat Toxicol.* 88(1):29-38.
- Johnson LL, Casillas E, Collier TK, McCain BB, Varanasi U. 1988. Contaminant effects on ovarian development in English Sole (*Parophrys-vetulus*) from Puget Sound, Washington. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 45 (12):2133-2146.
- Jolly S, Bado-Nilles A, Lamand F, Turies C, Chadili E, Porcher J-M, Betoulle S, Sanchez W. 2012. Multi-biomarker approach in wild European bullhead, *Cottus sp.* exposed to agricultural and urban environmental pressures: Practical recommendations for experimental design. *Chemosphere* 87 (7):675-683.
- Kalish J.M. 1991.  $^{13}\text{C}$  and  $^{18}\text{O}$  isotopic disequilibria in fish otoliths: metabolic and kinetic effects. *Marine Ecology Progress Series*, vol. 75, p. 191-203.
- Karels A, Soimasuo M, Oikari A. 1999. Effects of pulp and paper mill effluents on reproduction, bile conjugates and liver MFO (mixed function oxygenase) activity in fish at Southern Lake Saimaa, Finland. *Water Science and Technology* 40 (11-12):109-114.
- Karels AA, Manning S, Brouwer TH, Brouwer M. 2003. Reproductive effects of estrogenic and antiestrogenic chemicals on sheepshead minnows (*Cyprinodon variegatus*). *Environmental Toxicology and Chemistry* 22 (4):855-865.
- Katsiadaki I, Morris S, Squires C, Hurst MR, James JD, Scott AP. 2006. Use of the threespined stickleback (*Gasterosteus aculeatus*) as a sensitive in vivo test for detection of environmental antiandrogens. *Environmental Health Perspectives* 114:115-121.
- Katsiadaki I, Scott AP, Hurst MR, Matthiessen P, Mayer I. 2002. Detection of environmental androgens: A novel method based on enzyme-linked immunosorbent assay of spiggin, the stickleback (*Gasterosteus aculeatus*) glue protein. *Environmental Toxicology and Chemistry* 21 (9):1946-1954.
- Katsiadaki I, Scott AP, Mayer I. 2002. The potential of the three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus* L.) as a combined biomarker for oestrogens and androgens in European waters. *Marine Environmental Research* 54 (3-5):725-728.
- Ketata I, Denier X., Chaffai A. & Minier C. 2008. Endocrine-related reproductive effects in molluscs. *Comp. Biochem. Physiol.* 147: 261-270.
- Kidd KA, Blanchfield PJ, Mills KH, Palace VP, Evans RE, Lazorchak JM, Flick RW. 2007. Collapse of a fish population after exposure to a synthetic estrogen. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104 (21):8897-8901.
- Kime DE, Nash JP, Scott AP. 1999. Vitellogenesis as a biomarker of reproductive disruption by xenobiotics. *Aquaculture* 177(1-4):345-352.
- Kime, D. E., 1998. *Endocrine Disruption in Fish*. Kluwer Academic, Boston. 396.
- Kirby MF, Allen YT, Dyer RA, Feist SW, Katsiadaki I, Matthiessen P, Scott AP, Smith A, Stentiford GD, Thain JE, Thomas KV, Tolhurst L, Waldock MJ. 2004. Surveys of plasma vitellogenin and intersex in male flounder (*Platichthys flesus*) as measures of endocrine disruption by estrogenic contamination in United Kingdom estuaries: Temporal trends, 1996 to 2001. *Environmental Toxicology and Chemistry* 23 (3):748-758.
- Kling P., Norman A., Andersson P. L., Norrgren L., Förlin L. 2008. Gender-specific proteomic responses in zebrafish liver following exposure to a selected mixture of brominated flame retardants. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 71:319-327.
- Labadie, P.; Cundy, A. B.; Stone, K.; Andrews, M.; Valbonesi, S.; Hill, E. M., Evidence for the migration of steroidal estrogens through river bed sediments. 2007, *41*, (12), 4299-4304.
- Labadie, P.; Hill, E. M., Analysis of estrogens in river sediments by liquid chromatography-electrospray ionisation mass spectrometry - Comparison of tandem mass spectrometry and time-of-flight mass spectrometry. 2007, *1141*, (2), 174-181.
- Lacroix A., Fournier M., Lebeuf M., Nagler J.J., Cyr D.G. 2001. «Phagocytic response of macrophages from the pronephros of American plaice (*Hipoglossoides platessoides*) exposed to contaminated sediments from Baie des Anglais, Quebec». *Chemosphere*, vol. 45, no 4-5, Nov, p. 599-607. En ligne: <Go to ISI>://000171451900022.
- Lafite R., Romana A. 2001. A man-altered macrotidal estuary: the Seine estuary (France): introduction to the special issue *Estuaries*, 24:939.
- Langston, W. J., Pope, N. D., Jonas, P. J. C., Nikitic, C., Field, M. D. R., Dowell, B., Shillabeer, N., Swarbrick, R. H. & Browne, A. R. 2010. Contaminants in fine sediments and their consequences for biota of the Severn Estuary. *Marine Pollution Bulletin*. Volume 61, issues 1-3, 68-82. doi:10.1016/j.marpolbul.2009.12.014



- Langston, W., B. Chesman, G. Burt, S. Hawkins, J. Readman & P. Worsfold, 2003. Characterisation of the South West European Marine Sites : Plymouth Sound and Estuaries cSAC, SPA. Occasional Publications. Mar Biol Assoc Occ Pub 9:202p.
- Langston, W.J., and Burt, G.R. 2007. A review of TBT sediment data in the Fal and Helford SAC, Unpublished report for the Environment Agency
- Langston, W.J., Bryan, G.W., Burt, G.R. and Pope, N.D. 1994. Effects of sediment metals on estuarine benthic organisms, Project Record 105/2/A, National Rivers Authority, 49pp
- Langston, W.J., Burt, G.R. and Pope, N.D. 1999. Bioavailability of metals in sediments of the Dogger Bank (central North Sea): a mesocosm study. *Estuarine Coastal and Shelf Science*, 48, 519-540.
- Langston, W.J., Burt, G.R., & Chesman, B.S. 2007. Feminisation of male clams *Scrobicularia plana* from estuaries in South West UK and its induction by endocrine-disrupting chemicals. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 333:173-184.
- Langston, W.J., Chesman, B.S., Burt, G.R., Hawkins, S.J., Readman J., and Worsfold P. 2003. Characterisation of the South West European Marine Sites: The Fal and Helford cSAC. Marine Biological Association of the U K., Occasional Publication No. 8. pp 160.
- Lapointe D., Couture P. 2010. Accumulation and effects of nickel and thallium in early-life stages of fathead minnows (*Pimephales promelas*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, vol. 73, no 4, p. 572-578.
- Laroche J., O. Gauthier, L. Quiniou, A. Devaux, S. Bony, E. Evrard, J. Cachot, Y. Chérel, T. Larcher, R. Riso, V. Pichereau, M.H. Devier, H Budzinski. 2013. Variation patterns in individual fish responses to chemical stress among estuaries, seasons and genders: the case of the European flounder (*Platichthys flesus*) in the Bay of Biscay. *Environmental Science and Pollution Research* 20: 738-748.
- Larsson R, Nygren P. 1989. A rapid fluorometric method for semi-automated determination of cytotoxicity and cellular proliferation of human tumor cell lines in microculture. *Anticancer Res* 9:1111-1120.
- Lavado R, Thibaut R, Raldua D, Martin R, Porte C. 2004. First evidence of endocrine disruption in feral carp from the Ebro River. *Toxicology and Applied Pharmacology* 196 (2):247-257.
- Lee R.F., Steinert S. 2003. Use of the single cell gel electrophoresis/comet assay for detecting DNA damage in aquatic (marine and freshwater) animals. *Mutation Research-Reviews in Mutation Research*, 544: 43-64.
- Lesser M.P., Farrell J.H., Walker C.W. 2001. Oxidative stress DNA damage and p53 expression in the larvae of Atlantic cod (*Gadus morhua*) exposed to ultraviolet (290–400 nm) radiation. *Journal of Experimental Biology* 204, 157–164.
- Lett. 2006, 2, (3), 420-422.
- Liney, K. E.; Hagger, J. A.; Tyler, C. R.; Depledge, M. H.; Galloway, T. S.; Jobling, S., Health effects in fish of long-term exposure to effluents from wastewater treatment works. *Environ. Health Perspect.* 2006, 114, 81-89.
- Loizeau V., Abarnou A. 1995. Niveaux de contamination par les PCB dans le réseau trophique du bar et du flet. Rapport scientifique Seine Aval, Thème Edifices Biologiques, 85–120.
- Lower WR, Kendall RJ (1990) Biomarkers of Environmental Contamination. Boca Raton, USA: Lewis Publishers.
- Lu X.-J., J. Chen, Z.-A. Huang, L. Zhuang, L.-Z. Peng et Y.-H. Shi. 2012. Influence of acute cadmium exposure on the liver proteome of a teleost fish, ayu (*Plecoglossus altivelis*). *Molecular Biology Reports*, 39: 2851-2859.
- Lyons BP, Thain JE, Stentiford GD, Hylland K, Davies IM, Vethaak AD. 2010. Using biological effects tools to define good environmental status under the European Union Marine Strategy Framework Directive. *Mar Poll Bull*, 60: 1647-1651.
- Ma, T., Wan, X., Huang, Q., Wang, Z., Liu, J., 2005. Biomarker responses and reproductive toxicity of the effluent from a Chinese large sewage treatment plant in Japanese medaka (*Oryzias latipes*). *Chemosphere*, 59(2):281-288.
- Mackie, G. L. 1984. in Vol 7. Reproduction (eds. Wilbur, K. M., Tompa, A. S., Vedonk, N. H. & Van den Biggelaar, J. A. M.) 351-417. Academic Press, New York.
- Maltret-Geraudie P, Gerbron M, Minier C. 2008. Estrogenic response of wild roach from the Seine River (France). *Cybium* 32(2):256-257.
- Maltret-Geraudie P., Gerbron M., Minier C. 2008. Estrogenic response of wild roach from the Seine River (France). *Cybium*, 32: 256-257.
- Marchand J, Denis F, Laroche J. 2013. Evolutionary Toxicology & Transcriptomic Approaches. In: Amiard-Triquet C, Amiard JC, Rainbow PS. Ecological Biomarkers: Indicators of Ecotoxicological Effects. CRC Press. 361-383.
- Marchand J, Quiniou L, Riso R, Thébaud M T, Laroche J. 2004. Physiological cost of tolerance to toxicants in the European flounder *Platichthys flesus*, along the French Atlantic Coast. *Aquat Toxicol* 70: 327-343.
- Marchand J., A. Tanguy G. Charrier L. Quiniou E. Plee-Gauthier, J. Laroche. 2006. Molecular identification and expression of differentially regulated genes of the european flounder, *Platichthys flesus*, submitted to pesticide exposure. *Marine Biotechnology*, 8, 275-294.

- Marshall Adams S, Crumby WD, Greeley Jr MS, Shugart LR, Saylor CF. 1992. Responses of fish populations and communities to pulp mill effluents: A holistic assessment. *Ecotox Environ Safe* 24 (3):347-360.
- Martyniuk, C. J., R. J. Griffitt & N. D. Denslow, 2011b. Omics in aquatic toxicology: not just another microarray. *Environmental toxicology and chemistry / SETAC* 30(2):263-4 doi:10.1002/etc.428.
- Masson G. 1987. Biologie et ecologie d'un poisson plat amphihalain, le flet (*Platichthys flesus* Linne, 1758) dans l'environnement ligérien: distribution, démographie, place au sein des réseaux trophiques. Sciences: Brest: 1987.
- Mayon N, Bertrand A, Leroy D, Malbrouck C, Mandiki SNM, Silvestre F, Goffart A, Thome J-P, Kestemont P. 2006. Multiscale approach of fish responses to different types of environmental contaminations: A case study. *Science of the Total Environment* 367 (2-3):715-731.
- Meier S., Morton H. C., Andersson E., Geffen A. J., Taranger G. L., Larsen M., Petersen M., Djurhuus R., Klungsøyr J., Svarda I A. 2011. Low-dose exposure to alkylphenols adversely affects the sexual development of Atlantic cod (*Gadus morhua*): Acceleration of the onset of puberty and delayed seasonal gonad development in mature female cod. *Aquat Toxicol*, 105(1-2):136-150.
- Meziane, T., Tsuchiya, M., 2002. Organic matter in a subtropical mangrove- estuary subjected to wastewater discharge: origin and utilization by two macrozoobenthic species. *Journal of Sea Research* 47(1), 1–11.
- Milinkovitch, T., Ndiaye, A., Sanchez, W., Le Floch, S., Thomas-Guyon, H., 2011. Liver antioxidant and plasma immune responses in juvenile golden grey mullet (*Liza aurata*) exposed to dispersed crude oil. *Aquatic Toxicology* 101, 155–164.
- Minagawa M, Wada E. 1984. Stepwise enrichment of  $\delta^{15}\text{N}$  along food chains: further evidence and the relation between  $\delta^{15}\text{N}$  and animal age. *Geochimica Cosmochimica Acta*, 48, 1135-1140
- Minier C, Caltot G, Leboulenger F, Hill EM. 2000. An investigation of the incidence of intersex fish in Seine-Maritime and Sussex regions. *Analusis* 28:801-806.
- Minier C, Levy F, Rabel D, Bocquene G, Godefroy D, Burgeot T, Leboulenger F. 2000. Flounder health status in the Seine Bay. A multibiomarker study. *Marine Environmental Research* 50 (1-5):373-377.
- Minier C., Abarnou A., Jaouen-Madoulet A., Le Guellec A.M., Tutundjian R., Bocquené G., Leboulenger F. 2006. A pollution-monitoring pilot study involving contaminant and biomarker measurements in the Seine Estuary, France, using zebra mussels (*Dreissena polymorpha*). *Environ Toxicol Chem.*, 25(1):112-119.
- Minier C., Amara R. 2008. From pollution to altered fish physiological performance; the case of flatfish in the Seine estuary. In *Amiard-Triquet Environmental assessment of estuarine ecosystems*. Taylor and Francis. Boca Raton. 227-240.
- Moles A., Norcross B.L. 1997. Effects of oil-laden sediments on growth and health of juvenile flatfishes. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 55, 605–610.
- Monod G., De Mones A., Fostier A. 1993. Inhibition of ovarian microsomal aromatase and follicular oestradiol secretion by imidazole fungicides in rainbow trout. *Mar Environ Res*, 35:153–157.
- Monteoliva L. Albar J. P. 2004. Differential proteomics: an overview of gel and non-gel based approaches. *Briefings in Functional Genomics & Proteomics*, 3, 220–239.
- Moore, J.J., James, B., Minchin, A. & Davies, I.M. 2000. Surveys of dogwhelks *Nucella lapillus* in the vicinity of Sullom Voe, Shetland, August 1999. Report to the Shetland Oil Terminal Environmental Advisory Group (SOTEAG), prepared by CORDAH Ltd and the Fisheries Research Services.
- Munkittrick KR, McMaster ME, McCarthy LH, Servos MR, Van Der Kraak GJ. 1998. An overview of recent studies on the potential of pulp-mill effluents to alter reproductive parameters in fish. *Journal of Toxicology and Environmental Health-Part B-Critical Reviews* 1 (4):347-371.
- Munsch C., K. Moisan I. Truquet Tronczynski J. 1996. Caractérisation chimique de la contamination organique dans l'estuaire de la Seine. *Rapport Seine-Aval 1996/FIN-3* Agence de l'Eau Seine-Normandie, France.
- Nadzialek S, Depiereux S, Mandiki SNM, Kestemont P. 2011. In Vivo Biomarkers of Estrogenicity: Limitation of Interpretation in Wild Environment. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 60 (3):471-478.
- Navas JM, Segner H. 2006. Vitellogenin synthesis in primary cultures of fish liver cells as endpoint for in vitro screening of the (anti)estrogenic activity of chemical substances. *Aquat Toxicol* 80(1):1-22.
- Nilsen BM, Berg K, Edem JK, Kristiansen SV, Brion F, Porcher JM, Goksoyr A. 2004. Development of quantitative vitellogenin-ELISAs for fish test species used in endocrine disruptor screening. *Anal Bioanal Chem* 378:621-633.
- Noaksson E., Gustavsson, B., Linderöth, M., Zebühr, Y., Broman, D., Balk, L., 2004. Gonad development and plasma steroid profiles by HRGC/HRMS during one reproductive cycle in reference and leachate-exposed female perch (*Perca fluviatilis*). *Toxicol Appl Pharmacol*, 195(2):247-261.
- Noaksson E., Linderöth, M., Bosveld, A.T., Balk, L., 2003a. Altered steroid metabolism in several teleost species exposed to endocrine disrupting substances in refuse dump leachate. *Gen Comp Endocrinol*, 134(3):273-284.

- Noaksson E., Tjärnlund, U., Bosveld, A.T., Balk, L., 2001. Evidence for endocrine disruption in perch (*Perca fluviatilis*) and roach (*Rutilus rutilus*) in a remote Swedish lake in the vicinity of a public refuse dump. *Toxicol Appl Pharmacol*, 174(2):160-176.
- Noaksson, E., Linderöth, M., Bosveld, A.T.C., Norrgren, L., Zebühr, Y., Balk, L., 2003b. Endocrine disruption in brook trout (*Salvelinus fontinalis*) exposed to leachate from a public refuse dump. *Sci. Total Environ*, 305:87-103.
- Norton E.C., MacFarlane R.B., Mohr M.S. 2001. Lipid class dynamics during development in early life stages of shortbelly rockfish and their application to condition assessment. *Journal of Fish Biology* 58, 1010–1024
- Oliva J., F. Bardag-Gorce, J. Li, B. A. French, S.K. Nguyen, S.C. Lu & S.W. French, 2009. Betaine prevents Mallory–Denk body formation in drug-primed mice by epigenetic mechanisms. *Experimental and Molecular Pathology*, 86:77–86.
- Oliveira, M., Pachecho, M., Santos, M.A., 2008. Organ specific antioxidant responses in golden grey mullet (*Liza aurata*) following a short-term exposure to phenanthrene. *Science of the Total Environment* 396, 70–78.
- OSPAR 2008. 2007/2008 CEMP Assessment: Trends and concentrations of selected hazardous substances in sediments and trends in TBT-specific effects. OSPAR Commission publication 378/2008. 36pp
- Pacheco, M. et M.A. Santos. 2002. Biotransformation, genotoxic, and histopathological effects of environmental contaminants in European eel (*Anguilla anguilla* L.). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 53: 331-347.
- Pajares, M. et D. Pérez-Sala. 2006. «Betaine homocysteine S-methyltransferase: just a regulator of homocysteine metabolism?». *Cellular and Molecular Life Sciences*, 63: 2792-2803.
- Peck M.R., Labadie P., Minier C., Hill E.M. 2007. Profiles of environmental and endogenous estrogens in the zebra mussel *Dreissena polymorpha*. *Chemosphere*. 69:1-8.
- Peck, M.; Gibson, R. W.; Kortenkamp, A.; Hill, E. M., Sediments are major sinks of steroidal estrogens in two United Kingdom rivers. 2004, 23, (4), 945-952.
- Pelissero C, Flouriot G, Foucher JL, Bennetau B, Dunoguès J, Le Gac F, Sumpter JP. 1993. Vitellogenin synthesis in cultured hepatocytes; an *in vitro* test for the estrogenic potency of chemicals. *J Steroid Biochem Mol Biol* 44(3):263-272.
- Plante S., C. Audet Y. Lambert de la Noüe J. 2005. Alternative Methods for Measuring Energy Content in Winter Flounder. *North American Journal of Fisheries Management*, 25: 1-6.
- Pollux BJA, Korosi A. 2010. Use of stream mouth habitats by *Cottus perifretum* and *Leuciscus cephalus* along the River Meuse (the Netherlands). *Folia Zoologica* 59 (1):44-50.
- Priou F., Barbieri M. 2012. L'évolution démographique récente en France : une mortalité relativement faible aux grands ages. *Population*, 67(4) : 597-656.
- Quillardet P., Huisman O., D'Ari R. & Hofnung M. 1982. SOS Chromotest, a direct assay of induction of an SOS function in *Escherichia coli* K12 to measure genotoxicity. *Proceeding of the National. Academy of Sciences USA*, 79, 5971-5975.
- Rabilloud T., M. Chevallet, S. Luche & C. Lelong, 2010. Two-dimensional gel electrophoresis in proteomics: Past, present and future. *Journal of proteomics* 73(11):2064-2077. doi:10.1016/j.jprot.2010.05.016.
- Randák T, Zlábek V, Kolářová J, Svobodová Z, Hajslová J, Siroká Z, Jánská M, Pulkrabová J, Cajka T, Jarkovský J. 2006. Biomarkers Detected in Chub (*Leuciscus cephalus*; L.) to Evaluate Contamination of the Elbe and Vltava Rivers, Czech Republic. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 76 (2):233-241.
- Rasmussen TH, Teh SJ, Bjerregaard P, Korsgaard B. 2005. Anti-estrogen prevents xenoestrogen-induced testicular pathology of eelpout (*Zoarces viviparus*). *Aquatic Toxicology* 72 (3):177-194.
- Reyjol Y, Lena JP, Hervant F, Pont D. 2009. Effects of temperature on biological and biochemical indicators of the life-history strategy of bullhead *Cottus gobio* (vol 75, pg 1427, 2009). *Journal of Fish Biology* 75 (10):2880-2880.
- Ridgway, J., Breward, N. , Langston, W. J. , Lister, R., Rees J. G. and Rowlatt S. M. 2003 Distinguishing between natural and anthropogenic sources of metals entering the Irish Sea. *Applied Geochemistry* 18, 283-309
- Rocha Monteiro P.R., Reis-Henriques M.A., Coimbra J. 2000. Polycyclic aromatic hydrocarbons inhibit in vitro ovarian steroidogenesis in the flounder (*Platichthys flesus* L.), *Aquat. Toxicol*, 48:549–559.
- Rodríguez-Rúa, A., Prado, M., Romero, Z. & Bruzón, M. 2003. The gametogenic cycle of *Scrobicularia plana* (da Costa, 1778) (Mollusc: Bivalve) in Guadalquivir estuary (Cádiz, SW Spain). *Aquaculture* 217, 157-166.
- Rolland M., Le Moal J., Wagner V., Royère D., De Mouzon J. 2013. Decline in semen concentration and morphology in a sample of 26 609 men close to general population between 1989 and 2005 in France. *Human Reproduction*, 28 (2): 462-470.
- Rose W.L., Nisbet, R.M., Green, P.G., Norris, S., Fan, T., Smith, E.H., Cherr, G.N., Anderson S.L. 2006. Assessment of seasonal variability of biomarkers in three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus* L.) from a low contaminated stream: Implication for environmental biomonitoring. *Aquatic Toxicology* 80, 298–308.

- Rostkowski, P.; Horwood, J.; Shears, J. A.; Lange, A.; Oladapo, F. O.; Besselink, H. T.; Tyler, C. R.; Hill, E. M., Bioassay-Directed Identification of Novel Antiandrogenic Compounds in Bile of Fish Exposed to Wastewater Effluents. *Environ. Sci. Technol.* 2011, 45, (24), 10660-10667.
- Roubal WT, Lomax DP, Maryjean L, Lyndal LJ. 1997. Purification and partial characterization of English sole (*Pleuronectes vetulus*) vitellogenin. *Comp Biochem Physiol* **118B**:613-622.
- Rowe, C.L. 2003. Growth responses of an estuarine fish exposed to mixed trace elements in sediments over a full life cycle. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 54, 229–239.
- Ruiz, J.M., Barreiro, R. and González, J.J. 2005. Biomonitoring organotin pollution with gastropods and mussels. *Marine Ecology Progress*. 287; 169-176.
- Saborido-Rey, F., Dominguez-Petit, R., Tomas Morales-Nin, B., Alonso-Fernandez, A., 2007. Growth of juvenile turbot in response to food pellets contaminated by fuel oil from the tanker ‘Prestige’. *Marine Ecology Progress Series* 245, 271–279.
- Sanchez W, Ait-Aissa S, Palluel O, Ditché JM, Porcher JM. 2007. Preliminary investigation of multi-biomarker responses in three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus* L.) sampled in contaminated streams. *Ecotoxicology* 16 (2):279-287.
- Sanchez W, Goin C, Brion F, Olsson PE, Goksøyr A, Porcher JM. 2008a. A new ELISA for the three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus* L.) spiggin, using antibodies against synthetic peptide. *Comp Biochem Physiol C-Toxicol Pharmacol* 147 (1):129.
- Sanchez W, Katsiadaki I, Piccini B, Ditché JM, Porcher JM 2008b. Biomarker responses in wild three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus* L.) as a useful tool for freshwater biomonitoring: A multiparametric approach. *Environment International* 34 (4):490-498.
- Sanchez W, Sremski W, Piccini B, Palluel O, Maillot-Marechal E, Betoulle S, Jaffal A, Ait- Aissa S, Brion F, Thybaud E, Hinfray N, Porcher J-M. 2011. Adverse effects in wild fish living downstream from pharmaceutical manufacture discharges. *Environment International* 37 (8):1342-1348
- Sanchez W., Palluel O., Meunier L., Coquery M., Porcher J.M., Ait-Aïssa S. 2005. Copper-induced oxidative stress in three-spined stickleback: relationship with hepatic metal levels. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 19, 177–83.
- Sanchez W., Piccini B., Ditché J.M., Porcher J.M., 2008. Assessment of seasonal variability of biomarkers in three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus* L.) from a low contaminated stream: Implication for environmental biomonitoring. *Environment International* 34, 791–798.
- Sanchez, B. C., K. J. Ralston-Hooper, K. A. Kowalski, H. Dorota Inerowicz, J. Adamec & M. S. Sepulveda, 2009. Liver proteome response of largemouth bass (*Micropterus salmoides*) exposed to several environmental contaminants: potential insights into biomarker development. *Aquatic Toxicology* 95(1):52-59.
- Santos, M.M., Viera, N. Reis-Henriques, M.A., Santos, A.M., Gomez-Ariza, J.L., Giraldaez, I. and ten Hallers-Tjabbes, C.C 2004. Imposed and butyltin contaminants off the Oporto Coast (NW Portugal): a possible effect of the discharge of dredged material. *Environment International*. 30; 793-798.
- Schlenk D., Perkins E.J., Hamilton G., Zhang Y.S., Layher W. 1996. Correlation of hepatic biomarkers with whole animal and population/community metrics. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 56, 2299–2308.
- Segner H. 2009. Zebrafish (*Danio rerio*) as a model organism for investigating endocrine disruption. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*, 149(2):187-195.
- Segner H., Caroll K., Fenske M., Janssen C.R., Maack G., Pascoe D., Schäfers C., Vandenberg G.F., Watts M., Wenzel A., 2003. Identification of endocrine-disrupting effects in aquatic vertebrates and invertebrates: report from the European IDEA project. *Ecotoxicol Environ Saf*, 54(3):302-314.
- Selleslagh J.R., Amara R., Laffargue P., Lesourd S., Lepage M., Girardin M. 2009. Composition and functioning of three fish estuarine assemblages of the eastern English Channel: a comparison with French estuaries. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 81, 149–159.
- Sherry J, Gamble A, Fielden M, Hodson P, Burnison B, Solomon K. 1999. An ELISA for brown trout (*Salmo trutta*) vitellogenin and its use in bioassays for environmental estrogens. *Science of the Total Environment* 225 (1-2):13-31.
- Shilling A.D., Carlson D.B., Williams D.E. 1999. Rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, as a model for aromatase inhibition. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol*, 70:89–95.
- Skouras A., Broeg K., Dizer H., von Westernhagen H., Hansen P.D, Steinhagen D.. 2003. The use of innate immune responses as biomarkers in a programme of integrated biological effects monitoring on flounder (*Platichthys flesus*) from the southern North Sea. *Helgoland Marine Research*, 57: 190-198.
- Smeets JMW, Rankouhi TR, Nichols KM, Komen H, Kaminski NE, Giesy JP, Van den Berg M. 1999a. In Vitro Vitellogenin Production by Carp (*Cyprinus carpio*) Hepatocytes as a screening method for determining (anti)estrogenic activity of xenobiotics. *Toxicol Appl Pharmacol* 157(1):68-76.

- Smith, C.A., T. Farrah et R.G. Goodwin. 1994. The TNF receptor superfamily of cellular and viral proteins: Activation, costimulation, and death. *Cell*, 76: 959-962.
- Sola, J. 1997. Reproduction, population dynamics, growth and production of *Scrobicularia plana* da Costa (pelecypoda) in the Bidasoa estuary, Spain. *Netherlands Journal of Aquatic Ecology* 30, 283-296.
- Solé M., Raldua D., Piferrer F., Barceló D., Porte C. 2003. Feminization of wild carp, *Cyprinus carpio*, in a polluted environment: plasma steroid hormones, gonadal morphology and xenobiotic metabolizing system. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*, 136(2):145-156.
- Stentiford GD, Longshaw M, Lyons BP, Jones G, Green M, Feist SW. 2003. Histopathological biomarkers in estuarine fish species for the assessment of biological effects of contaminants. *Mar Environ Res*, 55: 137-159.
- Sumpter J. P., Jobling S. 1995. Vitellogenesis as a biomarker for estrogenic contamination of the aquatic environment. *Environ Health Perspect*, 103(7):173-178.
- Sumpter J.P. 2002. Endocrine disruption in the aquatic environment. In: *The Handbook of Environmental Chemistry Vol. 3, Part M, Endocrine Disruptors, Part II* (ed. by M. Metzler) Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Sumpter JP. 1998. Xenoendocrine disrupters - environmental impacts. *Toxicology Letters* 103:337-342.
- Tahara D, Hatano R, Iwatani H, Koya Y, Hayakawa Y. 2010. Annual changes in testicular development and occurrence of parasperm in the male reproductive organs of fourspine sculpin, *Cottus kazika*. *Ichthyological Research* 57 (1):62-70.
- Thain JE, Vethaak AD, Hylland K. 2008. Contaminants in marine ecosystems: developing an integrated indicator framework using biological-effect techniques. *ICES J Mar Sci* 65: 1508-1514.
- Thévenot, D., Meybeck, M., Chesterikov, A., Chevreuil, M., 1998. In: Meybeck M, de Marsily G, Fustec E, editors. *Métaux : sources multiples et accumulation, La Seine en son bassin, Fonctionnement écologique d'un système fluvial anthropisé*, Chap 9. Elsevier, Paris, 391- 437.
- Trubiroha A., Kroupova H., Wuertz S., Frank S.N., Sures B., Kloas W. 2010. Naturally-induced endocrine disruption by the parasite *Ligula intestinalis* (Cestoda) in roach (*Rutilus rutilus*). *Gen Comp Endocrinol*, 166(2):234-40.
- Tutundjian R, Minier C, LeFoll F, Leboulenger F. 2002. Rhodamine exclusion activity in primary cultured Turbot (*Scophthalmus maximus*) hepatocytes. *Mar Environ Res* 54:443-447.
- Tyler C. R., Sumpter, J. P., 1996. Oocyte growth and development in teleosts. *Fish Biol Fisheries*, 6(3):287-318.
- Tyler C.R., Jobling, S., Sumpter, J.P. 1998. Endocrine disruption in wildlife: a critical review of the evidence. *Crit Rev Toxicol*. 28(4):319-361.
- Tyler C.R., Lange, A., Paull, G.C., Katsu, Y., Iguchi, T., 2007. The roach (*Rutilus rutilus*) as a sentinel for assessing endocrine disruption. *Environ Sci*, 14(5):235-253.
- Tyler C.R., Pottinger, T.G., Santos, E., Sumpter, J.P., Price, S.A., Brooks, S., Nagler, J.J., 1996. Mechanisms controlling egg size and number in the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Biol Reprod*, 54(1):8-15.
- Tyler CR, van Aerle R, Hutchinson TH, Maddix S, Trip H. 1999. An *in vivo* testing system for endocrine disruptors in fish early life stages using induction of vitellogenin. *Environmental Toxicology and Chemistry* 18 (2):337-347.
- Urbatzka, R.; van Cauwenberge, A.; Maggioni, S.; Vigano, L.; Mandich, A.; Benfenati, E.; Lutz, I.; Kloas, W., Androgenic and antiandrogenic activities in water and sediment samples from the river Lambro, Italy, detected by yeast androgen screen and chemical analyses. *Chemosphere*. 2007, 67, (6), 1080-1087.
- van Aerle R, Nolanusan M, Jobling S, Christiansen LB, Sumpter JP, Tyler CR. 2001. Sexual disruption in a second species of wild cyprinid fish (the gudgeon, *Gobio gobio*) in United Kingdom Freshwaters. *Environmental Toxicology and Chemistry* 20 (12):2841-2847.
- Van den Belt K, Wester PW, Van der Ven LTM, Verheyen R, Witters H. 2002. Effects of ethynylestradiol on the reproductive physiology in zebrafish (*Danio rerio*): Time dependency and reversibility. *Environmental Toxicology and Chemistry* 21 (4):767- 775.
- Van Der Kraak G.J., Munkittrick K.R., McMaster M.E., Portt C.B., Chang J.P. 1992. Exposure to bleached kraft pulp mill effluent disrupts the pituitary-gonadal axis of white sucker at multiple sites. *Toxicol. Appl. Pharmacol*, 115: 224-233.
- Van der Ven LTM, Wester PW, Vos JG. 2003. Histopathology as a tool for the evaluation of endocrine disruption in zebrafish (*Danio rerio*). *Environmental Toxicology and Chemistry* 22 (4):908-913.
- Vandegheuchte M. B., Janssen C. R. 2011. Epigenetics and its implications for ecotoxicology. *Ecotoxicology* 20(3):607-624.
- Vethaak AD, Wester PW (1996) Diseases of flounder *Platichthys flesus* in Dutch coastal and estuarine waters, with particular reference to environmental stress factors. II. Liver histopathology. *Dis Aqua Org*, 26: 99-116.
- Vinggaard, A. M.; Niemela, J.; Wedebye, E. B.; Jensen, G. E., Screening of 397 chemicals and development of a quantitative structure-activity relationship model for androgen receptor antagonism. *Chem. Res. Toxicol*. 2008, 21, (4), 813-823.

- Vos JG, Dybing E, Greim HA, Ladefoged O, Lambre C, Tarazona JV, Brandt I, Vethaak AD (2000) Health effects of endocrine-disrupting chemicals on wildlife, with special reference to the European situation. *Critical Reviews in Toxicology* 30 (1):71-133.
- Walker C, Kaiser K, Klein W, Lagadic L, Peakall D, Sheffield S, Soldan T, Yasuno M. 1998. 13th Meeting of the scientific group on methodologies for the safety evaluation of chemicals (SGOMSEC): alternative testing methodologies for ecotoxicity. *Environ Health Perspect* 106:441-451.
- Wang J., Y. Wei D. Wang L.L. Chan J. Dai. 2008. Proteomic study of the effects of complex environmental stresses in the livers of goldfish (*Carassius auratus*) that inhabit Gaobeidian Lake in Beijing, China. *Ecotoxicology*, 17(3):213–220.
- Wei Y., Chan L.L., Wang D., Zhang H., Wang J., Dai J. 2008. Proteomic analysis of hepatic protein profiles in rare minnow (*Gobiocypris rarus*) exposed to perfluorooctanoic acid. *Journal of Proteome Research* 7:1729–1739.
- Weiss, J. M.; Hamers, T.; Thomas, K. V.; van der Linden, S.; Leonards, P. E. G.; Lamoree, M. H., Masking effect of anti-androgens on androgenic activity in European river sediment unveiled by effect-directed analysis. *Anal. Bioanal. Chem.* 2009, 394, (5), 1385-1397.
- Williams T. D., Diab A., Ortega F., Sabine V. S., Godfrey R. E., Falciani F., Chipman J. K., George S. G. 2008. Transcriptomic responses of European flounder (*Platichthys flesus*) to model toxicants. *Aquat Toxicol* 90(2):83-91 doi:10.1016/j.aquatox.2008.07.019.
- Wirgin I et al. 2011. Mechanistic basis of resistance to PCBs in Atlantic tomcod from the Hudson river. *Science*, vol. 331: 1322-1325.
- Wirgin I., Waldman J.R.. 1998. Altered gene expression and genetic damage in North American fish populations. *Mutation Research-Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 399: 193-219.
- Woo S., Yum S. 2011. Transcriptional response of marine medaka (*Oryzias javanicus*) on exposure to toxaphene. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 153:355–361.
- Xu W., I.G. Charles et S. Moncada. 2005. «Nitric oxide: orchestrating hypoxia regulation through mitochondrial respiration and the endoplasmic reticulum stress response». *Cell Res*, 15 : 63-65.
- Yum S., S. Woo E. Choi S. Kim R. Oh S. Lee, Lee T.K.. 2005. Analysis of Gene Expression in Benzo[a]pyrene-exposed *Sebastes schlegelii* using Differential Display Polymerase Chain Reaction. *J Environ Toxicol*, vol. 20, no 1, p. 67-73.
- Yunker M.B., MacDonald R.W., Goyette D., Paton D.W., Fowler B.R., Sullivan D., Boyd J. 1999. Natural and anthropogenic inputs of hydrocarbons to the strait of Georgia. *Sci. Total Environ.*, 225 : 181-209.
- Zanuy S, Carrillo M, Mateos J, Trudeau V, Kah O. 1999. Effects of sustained administration of testosterone in pre-pubertal sea bass (*Dicentrarchus labrax* L). *Aquaculture* 177 (1- 4):21-35.
- Zelikoff J.T. 1998. Biomarkers of immunotoxicity in fish and other non-mammalian sentinel species: predictive value for mammals?. *Toxicology*, vol. 129, no 1, Aug. p. 63-71.
- Ziv T., T. Gattegno, V. Chapovetsky, H. Wolf, E. Bamea, E. Lubzens & A. Admon, 2008. Comparative proteomics of the developing fish (zebrafish and gilthead seabream) oocytes. *Comparative Biochemistry and Physiology Part D*, 3:12–35.

## VII. COMMUNICATION DES RESULTATS

### VII.1. Vue générale

Conformément aux objectifs inscrits dans le projet, les chercheurs ont investi beaucoup de leur temps pour communiquer sur les travaux réalisés. Cela implique tout d'abord des échanges entre chercheurs du projet au cours de prélèvements sur le terrain, expériences en laboratoire et réunions spécifiques. Les résultats et l'expérience acquis ont ensuite pu être disséminés vers différents publics :

- les institutions publiques au travers de réunions avec les partenaires du projet ou de réunions thématiques organisées par des tiers ;
- la communauté des pêcheurs grâce aux opérations de pêches ;
- les industriels au cours de congrès et réunions;
- le public par des participations à des opérations « grand public » ou des interviews télévisées;
- les étudiants des universités car les résultats servent d'illustrations aux cours délivrés ;
- la communauté scientifique lors de congrès nationaux et internationaux.

Puisque l'un des objectifs particuliers était de contribuer à la réflexion et la mise en place d'outils de gestion de l'environnement aquatique, des échanges réguliers ont eu lieu avec des personnes de l'ONEMA et de l'Agence de l'Eau ainsi que de l'Environmental Agency. Un transfert de l'outil « intersex scrobiculaire » a été effectué au cours de deux journées dédiées de démonstration, d'échantillonnage et d'échanges, entre les chercheurs du Marine Biological Association et de l'Université du Havre et les responsables de la gestion de la zone naturelle de la Baie de Saint Brieuc (23-24 juillet 2012). Les mesures ont été réalisées de façon autonome par les responsables de la zone naturelle en 2013.

### VII.2. Communications au grand public

#### *VII.2.1. Colloques ouverts ou destinés au grand public*

- Perturbateurs endocriniens et biodiversité. Colloque du Réseau Environnement Santé et World Wide Fund for Nature. MNHN, 28 avril 2011.
- Chemical contaminants and the sexual chemistry of fish and foetal health. Open lecture for the general public and staff. University of Sussex, May 2012.
- Qualité des eaux et santé des organismes : Quels composés biologiquement actifs ? Quels effets sur le système hormonal, sur le système immunitaire ? Réunion de restitution du programme Européen DIESE, Le Havre, 5 juin 2013.

#### *VII.2.2. Emmissions télévisées*

- « Une rivière de médicaments », Global Mag, Arte, 19 juin 2009
- « Estuaire de la Seine, une pollution invisible », Thalassa (France 3), mai 2009
- « Du poison dans l'eau du robinet », France 3, 17 mai 2010
- « Du poison dans l'eau du robinet », Les documentaires France 3, 27 aout 2013
- « Le Zapping » Canal plus, 30 aout 2013

### VII.3. Communications scientifiques

#### VII.3.1. Communications orales lors de congrès scientifiques

Cinquante-sept communications orales ainsi que de nombreuses communications sous forme d'affiche (non listées ici) ont été présentées dans des congrès scientifiques.

- Calves I., C. Dupuy, E. Lavergne, C. Galland, C. Capitaine, N. Pédrón, G. Charrier, B. Guinand, L. Quiniou, J. Laroche. 2011. Structure génétique et réponses aux multi-stress de populations de flet (*Platichthys flesus*) sur un cline latitudinal. ECOBIM 2011: Atelier international sur l'évaluation du stress environnemental (Effets biologiques des contaminants chimiques chez les bivalves et les poissons). Institut Maurice-Lamontagne, Mont-Joli, Québec, 6-9 juin 2011.
- Calves I., Lavergne E., Leïla Meistertzheim A., Charrier G., Cabral H., Guinand B., Quiniou L., Laroche J. Genetic structure of the European flounder (*Platichthys flesus*) considering the southern limit of the species' range and the potential impact of chemical stress. 8<sup>th</sup> International Flatfish Symposium, Ijmuiden, The Netherlands, 5-11 novembre 2011.
- Ciocan Corina M., 2012. Reference gene selection for qPCR in mussels – will we ever find a “universal housekeeping gene”? Presentation given by Dr. Corina Ciocan at the University of Le Havre, February 2012.
- Ciocan Corina M., Elena Cubero Leon, Jeanette Rotchell -2011. Using new molecular techniques to highlight cellular pathways affected by endocrine disruption. Oral presentation, Interreg IV DIESE CRONEXPO Joint Meeting Caen 2011.
- Ciocan Corina M., Elena Cubero-Leon, Keith Cornelius, Mika Peck, William J. Langston, Nick Pope, Christophe Minier and Jeanette M. Rotchell. 2013. Proliferating cell nuclear antigen in the gonad of *Scrobicularia plana*: molecular cloning and expression pattern in clams from natural populations. Poster Presentation, PRIMO 17, Algarve, Portugal.
- Ciocan Corina M., Elena Cubero-Leon, Liz Hill, Diana Alvarez Munoz, Mika Peck, Keith Cornelius, William J. Langston, Nick Pope, Christophe Minier and Jeanette M. Rotchell. 2013. Using expression of testes specific genes to assess the effects of environmental endocrine disruptors in gonads of clams (*scrobicularia plana*) from contaminated coastal areas. Platform presentation, 7<sup>th</sup> International Conference on Marine Pollution and Ecotoxicology, Hong Kong.
- Ciocan Corina M., Elena Cubero-Leon, William J. Langston, Nick Pope, Christophe Minier, Frauke Seemann and Jeanette M. Rotchell. Intersexuality in *Scrobicularia plana*: transcriptomic analysis reveals novel genes involved in endocrine disruption. Poster presentation, SETAC 2012, Berlin.
- Ciocan Corina M., Elena Cubero-Leon, William J. Langston, Nick Pope, Christophe Minier and Jeanette M. Rotchell. Molecular cloning and characterization of several sex related genes in the bivalve *Scrobicularia plana* (Veneroida). Platform presentation, ESCPB Congress 2012, Bilbao, Spain.
- Ciocan Corina, 2013. Mechanisms of endocrine disruption in molluscs. Oral presentation, Final Diese meeting, Le Havre, France June 5th.
- Dupuy C., Auffret M., Calves I., Claireaux G., Théron M., Amerand A., Galland C., Guérard F., Loizeau V., Quiniou L., Sanchez W., Fournier M., Laroche J. (2011). Etude de populations naturelles de flets le long d'un gradient latitudinal : biomarqueurs aux niveaux cellulaire, biochimique et physiologique. Colloque d'Immunotoxicologie, Armand-Frappier, 17-19 novembre 2011, Esterel, Québec (Canada)
- Dupuy C., Calves I., Pedron N., França S., Vasconcelos RP., Auffret M., Quiniou L., Laroche J. (2012). Cellular and molecular responses of the European flounder (*Platichthys flesus*) to the effects of climate change, hypoxia and chemical stress, in several estuaries from France to Portugal. 28<sup>th</sup> Congress – European Society for Comparative Physiology and Biochemistry – Bilbao, 2-5 September 2012.
- Dupuy C., C. Galland, I. Calves, M. Auffret, M. Labonne, L. Quiniou, V. Pichereau, J. Laroche. 2011. Responses of flounder populations to multi-stress in estuaries: Immunotoxicity, biochemical biomarkers, Isotopes, Life-history traits and population genetics. Joint meeting CHRONEXPO/DIESE at the University of Caen, INTERREG IV. 30-31 August 2011.
- Dupuy C., C. Oudard, M. Auffret, M. Labonne, E. Morize, L. Quiniou & J. Laroche, 2010. Integration of physiological, immunotoxic and genetic responses of the flounder *Platichthys flesus*, in contaminated estuaries. Second Annual Steering Committee. DIESE Project, INTERREG IVA, Plymouth: 17<sup>th</sup> may 2010



- Dupuy C., I. Calves, W. Sanchez, M. Fournier, M. Auffret, L. Quiniou, J. Laroche. 2011. Réponses aux stress chimiques de deux espèces sentinelles de la qualité des milieux estuariens en France et au Québec : le flet et le poulamon. Colloque du GDR EXECO, Arcachon : 7-8 avril 2011.
- Dupuy C., M. Auffret, I. Calves, G. Claireaux, M. Théron, A. Amérand, C. Galland, F. Guérard, V. Loizeau, L. Quiniou, W. Sanchez, M. Fournier, J. Laroche. 2011. Etude de populations naturelles de flets le long d'un gradient latitudinal : biomarqueurs aux niveaux cellulaire, biochimique et physiologique. ECOBIM 2011: Atelier international sur l'évaluation du stress environnemental (Effets biologiques des contaminants chimiques chez les bivalves et les poissons). Institut Maurice-Lamontagne, Mont-Joli, Québec, 6-9 juin 2011.
- Galland C, Dupuy C, Capitaine C, Claves I, Auffret M, Quiniou L, Laroche J, Pichereau V (2011). Comparisons of liver proteomes in European flounder *Platichthys flesus* from three contrasted estuaries. 8<sup>th</sup> International Flatfish Symposium, Ijmuiden, The Netherlands, 5-11 novembre 2011.
- Galland C, Dupuy C, Quiniou L, Auffret M, Laroche J, Pichereau V. (2012). Response of the European flounder *Platichthys flesus* to experimental and *in situ* contaminations: a proteomic approach. 28<sup>th</sup> Congress – European Society for Comparative Physiology and Biochemistry – Bilbao, 2-5 September 2012.
- Galland C. Réponse du flet Européen *Platichthys flesus* à la contamination chimique : approche protéomique. Colloque de restitution final, INTERREG IVA DIESE, Le Havre, 5 juin 2013.
- Galland C., C. Dupuy, C. Capitaine, I. Calves, M. Auffret, L. Quiniou, J. Laroche, V. Pichereau. 2011. Proteomic analysis of the European flounder *Platichthys flesus* response to HAP/PCB contamination. SETAC EUROPE Annual Meeting, Milan, Italy, 15-19 May 2011.
- Galland C., C. Dupuy, C. Capitaine, I. Calves, M. Auffret, L. Quiniou, J. Laroche, V. Pichereau. 2011. Réponse du flet européen *Platichthys flesus* à la contamination par les HAP/PCB : approche par électrophorèse 2D. ECOBIM 2011: Atelier international sur l'évaluation du stress environnemental (Effets biologiques des contaminants chimiques chez les bivalves et les poissons). Institut Maurice-Lamontagne, Mont-Joli, Québec, 6-9 juin 2011.
- Géraudie P., Gerbrun M., Hinfrey N., Brion F., Rotchell J., Hill E.M., Minier C. Steroidogenesis in wild roach (*Rutilus rutilus*): alterations by environmental pollutants. PRIMO 15 symposium (Pollutant responses in marine organisms). Bordeaux May 17-20, 2009.
- Geraudie P., Nahrgang J., Marie G., Minier C., Camus L. Is produced water able to alter endocrine function and reproduction in polar cod (*boreogadus saida*) during chronic exposure with realistic environmental concentrations? PRIMO 16 symposium (Pollutant responses in marine organisms). Long Islands, CA, May 15-18, 2010.
- Gerbrun M., P. Geraudie, B. Xuereb, E.M. Hill, J. R. Rotchell, C. Minier. Combined effect of cadmium and estradiol on the endocrine system of roach (*Rutilus rutilus*): *In vitro* and *in vivo* approaches. ESCBP meeting, 2-5 September, 2012, Bilbao, Spain.
- Gerbrun M., P. Geraudie, B. Xuereb, J. R. Rotchell, C. Minier. *In vitro* and *in vivo* determination of the Cadmium interactions with the endocrine system of Roach (*Rutilus rutilus*), 16<sup>th</sup> International Symposium on Pollution Responses in Marine Organisms PRIMO16, 15-18 May 2011, Long Beach, California, USA
- Hill E.M. Are we living in a world contaminated with antiandrogenic chemicals? NORMAN network workshop, Amsterdam, November 2012.
- Hill E.M., Al-Sahli, R.A., Abdul-Sada, A., Lange, A., and Tyler, C.R. The xenometabolome and novel contaminant markers in fish exposed to a wastewater treatment works effluent. 28<sup>th</sup> Congress European Society for Comparative Physiology and Biochemistry – Bilbao, 2-5 September 2012.
- Hill E.M., Cubero E., Rotchell J.M., Minier C., Flores-Valverde A.M. Investigating pathways of aquatic toxicity of environmental estrogens using metabolomic analyses. PRIMO 15 symposium (Pollutant responses in marine organisms). Bordeaux May 17-20, 2009.
- Kerambrun, E., Henry, F., Cornille, V., Courcot, L., and Amara, R. Metal bioconcentrations and condition indices in juvenile European flounders, *Platichthys flesus*, from European estuaries. 50th Estuarine and Coastal Sciences ECSA 50, 3-7 June 2012, Venice, Italy.
- Kerambrun, E., Henry, F., Sanchez, W., Gevaert, F., Spilmont, N. and Amara, R. Physiological performance of caged juvenile sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and turbot (*Scophthalmus maximus*) in a contaminated area. 47th Estuarine and Coastal Sciences ECSA 47, 14-19 September 2010, Figueira Da Foz, Portugal.

- Kerambrun, E., Le Floch, S., Thomas-Guyon, H., Sanchez, W. and Amara, R. Etude des relations entre les réponses de biomarqueurs et les performances physiologiques de juvéniles de bar commun, *Dicentrarchus labrax* exposés à une contamination au pétrole. 25<sup>e</sup> Forum des jeunes océanographes, 28-29 octobre 2009, La Rochelle, France.
- Kerambrun, E., Perrichon, P., Henry, F., Sanchez, W., and Amara, R. Influence de sédiments contaminés sur les performances physiologiques et les réponses de biomarqueurs de juvéniles de turbot *Scophthalmus maximus*. 26<sup>e</sup> Forum des jeunes océanographes, 30 septembre et 1<sup>er</sup> octobre 2010, Wimereux, France.
- Kerambrun, E., Perrichon, P., Henry, F., Sanchez, W., Courcot, L. and Amara R. Growth, condition indices and biomarker responses of juvenile turbot, *Scophthalmus maximus*, exposed to contaminated sediment. 16<sup>th</sup> International Symposium on Pollution Responses in Marine Organisms PRIMO16, 15-18 May 2011, Long Beach, California, USA.
- Labonne M, Calves I, Dupuy C, Claireaux G, Amérand A, Théron M, Loizeau V, Dabas E, Munaron JM, Cabral H, Vasconcelos RP, França S, Quiniou L, Laroche J (2012). Réponses phénotypiques du flet (*Platichthys flesus*) dans des estuaires à environnements contrastés, sur un cline Nord-Sud. *Rencontre de l'Ichtyologie en France, Paris, 27-30 mars 2012*.
- Langston WJ, Pope ND. Endocrine Disruption (ED) in *Scrobicularia plana*. Shellfish Association, Fishmongers Hall, London, Feb 2010.
- Langston WJ. Pollution indicators. MBA annual science conference. Plymouth, April 2012.
- Laroche J, Calves I, Claireaux G, Amérand A, Théron M, Loizeau V, Labonne M, Sanchez W, Cabral H, Vasconcelos RP, França S, Pedron N, Quiniou L (2012). Climate change, hypoxia and chemical stress : Impacts on the energetic metabolism of the European flounder *Platichthys flesus*. Colloque franco-Québécois ECOBIM, Reims 5-8 juin 2012.
- Laroche J, Dupuy C. (2013). Intégration des réponses moléculaires, biochimiques et immunotoxicologiques face aux contaminants. Colloque de restitution final, INTERREG IVA DIESE, Le Havre, 5 juin 2013.
- Laroche J, Marchand J, Quiniou L. (2013). Relations genotypes-phénotypes dans des populations de flet (*Platichthys flesus*) exposées à des contaminations différentielles en estuaires. Colloque franco-Québécois ECOBIM, Montréal, 27-30 mai 2013.
- Laroche J. (2013). Approche intégrative en écotoxicologie sur un poisson estuarien, le flet (*Platichthys flesus*). Colloque de l'ARET (Association de Recherche en Toxicologie et Ecotoxicologie), Paris, 20-21 juin 2013.
- Laroche J., I. Calves, C. Dupuy, C. Galland, M. Auffret, V. Pichereau, C. Capitaine, M. Labonne, E. Dabas, J.M. Munaron, F. Guérard, L. Quiniou, G. Claireaux, M. Théron, A. Amérand, V. Loizeau, D. Mazurais, J. Zambonino, N. Le Bayon, H. Cabral, R. Vasconcelos, S. Franca, M. Fournier, C. Couillard . 2011. Approche intégrative de la réponse de populations de poissons aux multi-stress en milieu estuarien. ECOBIM 2011: Atelier international sur l'évaluation du stress environnemental (Effets biologiques des contaminants chimiques chez les bivalves et les poissons). Institut Maurice-Lamontagne, Mont-Joli, Québec, 6-9 juin 2011.
- Laroche J., L. Quiniou, E. Evrard, A. Devaux, S. Bony 2010. Responses of juvenile European flounder (*Platichthys flesus*) to multi-stress in the Vilaine estuary, during a six-month survey. Second Annual Steering Committee. DIESE Project, INTERREG IVA, Plymouth: 17<sup>th</sup> may 2010
- Laroche J., L. Quiniou, E. Evrard, A. Devaux, S. Bony 2010. Un exemple d'approche intégrative: réponses de juvéniles de flet (*Platichthys flesus*) au multi-stress en estuaire de Vilaine, durant un suivi de 6 mois. ECOBIM 2010: Atelier international sur l'évaluation du stress environnemental (Effets biologiques des contaminants chimiques chez les bivalves et les poissons). Ifremer, Nantes : 18-19 mai 2010.
- Maréchal A., Fernandes D., Rotchell JR, Porte C., Minier C. Antiandrogenic effects in roach (*Rutilus rutilus*): an *in-situ* study based on the assessment of male gonadal steroidogenesis activities. ESCBP meeting, 2-5 September, 2012, Bilbao, Spain.
- Minier C. Determination of Indicator for Environmental monitoring: a Strategy for Europe. Gagileau Workshop. Bordeaux November, 29-30<sup>th</sup>, 2010.
- Minier C. Effects of xeno-estrogens, androgens and anti-androgens on fish and mollusc from the Seine River. Malang, Brawijaya University (Indonesia), January 2, 2012 International conference on Ecotoxicology.
- Minier C. Effects of xeno-estrogens, androgens and anti-androgens on fish, crustaceans and mollusk. Cape Town (South Africa), University of the Western Cape, July 30<sup>th</sup>, 2012.

- Minier C. Endocrine-disrupting effects of anti-androgens on fish and mollusk physiology. Taipei University (Taiwan), September 11<sup>th</sup>, 2012.
- Minier C. Estrogenic, androgenic and anti-estrogenic effects in fish from the French streams. 15<sup>th</sup> symposium on toxicity assessment (ISTA15). Metz, August 30 – September 4, 2009.
- Minier C., Geraudie P., Hinfray N., Porcher J.-M., Brion F., Hill E., Rotchell J. R. Effects of xeno-estrogen and anti-androgens on fish from the seine river. 15<sup>th</sup> symposium on toxicity assessment (ISTA15). Hong-Kong, July 2–8, 2011.
- Minier C., Gerbron M., Geraudie P., Xuereb B., Denier X., Hill E.M., Rotchell J.R. combined effect of cadmium and estradiol on the endocrine system of roach (*Rutilus rutilus*): *In vitro* and *in vivo* studies. 16<sup>th</sup> symposium on toxicity assessment (ISTA16). Cape Town, February 21–26, 2012.
- Minier C., Rotchell J.M., Hill E., Monsinjon T., Knigge T. Endocrine disrupting effects in bivalves. 14th International Symposium on Toxicity Assessment (ISTA14), Metz, August 30 - September 4, 2009.
- Pedron N, Lavergne E, Calvès I, Mazurais D, Zambonino J, Le Bayon N, Quiniou L, Laroche J. (2013). Does the chronic chemical contamination of a European flounder population decrease its thermal tolerance? PRIMO 17, Pollutant responses in marine organisms, Algarve, 5<sup>th</sup>-8<sup>th</sup> May 2013.
- Pope ND, Langston WJ. Water quality and shellfish. Workshop at Cefas Weymouth 8-9th February 2010.
- Sanchez W., Villeret M., Piccini B., Minier C., Sremski W., Blanchard C., Porcher J.M. Androgenic contamination of freshwater ecosystems cannot be ignored for environmental risk assessment. 3<sup>rd</sup> SETAC Europe special science symposium, Brussels, 2-3 February 2011.
- Seemann F., Monsinjon T., Knigge T., Minier C. Impact of 17- $\beta$  estradiol on the development of sea bass immune system. PRIMO 16 symposium (Pollutant responses in marine organisms). Long Islands, CA, May 15-18, 2010.
- Seemann F., T. Monsinjon, S. Olivier, T. Knigge, C. Minier. Impairment of juvenile sea bass (*Dicentrarchus labrax*) innate immunity following waterborne 17- $\beta$  estradiol exposure is reversible. ESCBP meeting, 2-5 September, 2012, Bilbao, Spain.
- Seemann F., T. Monsinjon, T. Knigge, C. Minier. Impact of 17- $\beta$  estradiol on the development of sea bass immune system, 16<sup>th</sup> International Symposium on Pollution Responses in Marine Organisms PRIMO16, 15-18 May 2011, Long Beach, California, USA.
- Wessel N., F. Henaff, V. Buchet, A. Sévère, N. Le Bayon, A. M. Le Guellec, K. Héas-Moisán, C. Munsch, V. Loizeau, C. Minier. Reproductive disruption induced on common sole (*Solea solea*) following *in vivo* exposure to polybrominated diphenyl ethers and polychlorinated biphenyls. 16<sup>th</sup> International Symposium on Pollution Responses in Marine Organisms PRIMO16, 15-18 May 2011, Long Beach, California, USA.

### VII.3.2. Documents et chapitres de livres

- Amara, R., 2011. Impact de la pollution sur les écosystèmes côtiers : exemple de la Manche orientale. *Vertigo - la revue électronique en sciences de l'environnement*, Hors série 9. <http://vertigo.revues.org/10990>.
- Minier, C., Amara, R., 2009. From pollution to altered fish biological and physiological performances; the case of flatfish in the Seine estuary. In 'Environmental assessment of estuarine ecosystems: a case study'. Eds: C. Amiard-Triquet and P.S. Rainbow, CRCPress / Taylor and Francis. 344 pp.
- Gubbins M.J., Huet M., Reiner M.M., Minier C. 2013. Impairment of endocrine functions : case studies. In Amiard-Triquet C., Amiard J.-C. and Rainbow P.S., *Ecological biomarkers*. CRC Press. pp 219-252.

### VII.3.3. Publications dans des journaux scientifiques

Trente-cinq manuscrits ont été soumis pour publication et acceptés dans des journaux scientifiques de rang international.

- Boulangé-Lecomte C., Géraudie P., Forget-Leray J., Gerbron M. Minier C. 2011. Another brick in the worm: *Ligula intestinalis* manipulates its main host, the Roach (*Rutilus rutilus*), by interfering with brain and gonad aromatase expression. *J. Helminthology*. 85: 339-344.

- Calves I., Lavergne E., Meistertzheim A.L., Charrier G., Cabral H., Guinand B., Quiniou L., Laroche J. (2013). Genetic structure of European flounder (*Platichthys flesus*): effects of both the southern limit of the species' range and chemical stress. *Marine Ecology Progress Series*. 472, 257-273
- Ciocan C., Cubero-Leon E., Minier C., Rotchell J.M. 2011. Identification of reproduction-specific genes associated with maturation and estrogen exposure in a marine bivalve *Mytilus edulis*. *PlosOne*, 6(7): e22326. doi:10.1371/journal.pone.0022326.
- Ciocan C.M., Cubero-Leon E., Puinean A.M., Hill E.M., Minier C., Osada M., Fenlon K., Rotchell J.M. 2010. Effects of estrogen exposure in mussels, *Mytilus edulis*, at different stages of gametogenesis. *Environ. Pollut.* 158:2977-2984.
- Corina Ciocan M., William J. Langston, Nick Pope, Keith Cornelius, Christophe Minier and Jeanette Rotchell. 2012. Intersex in *Scrobicularia plana* – transcriptomic analysis reveals novel genes involved in endocrine disruption. *Environmental Science and Technology* 46: 12936-12944.
- Cubero-Leon E., Ciocan C. M., Hill E. M., Osada M., Kishida M., Itoh N., Kondo R., Minier C., Rotchell J.M. 2010. Estrogens disrupt *serotonin receptor* and *cyclooxygenase* gene expression in the gonads of mussels (*Mytilus edulis*). *Aquat. Toxicol.* 98: 178-187.
- Cubero-Leon E., Minier C., Rotchell J., Hill E.M. 2012. Metabolomic analysis of sex specific metabolites in gonads of the mussel, *Mytilus edulis*. *Comp. Biochem. Physiol.* D7. 212-219.
- Cubero-Leon E., Puinean A.M., Labadie P., Ciocan C., Itoh N., Kishida M., Osada M., Minier C., Hill E.M., Rotchell J.M. 2012. Two novel CYP3A genes in the marine mussel *Mytilus edulis*: mRNA expression modulation following short-term exposure to endocrine disruptors. *Mar Environ Res.* 74. 32-39.
- Cubero-Leon Elena, Corina M. Ciocan, Christophe Minier, Jeanette M. Rotchell 2012 Reference gene selection for qPCR in mussel, *Mytilus edulis*, during gametogenesis and exogenous estrogen exposure. *Environmental Science and Pollution Research* 19:2727-2733.
- Dupuy C, Couillard C, Laroche J, Brousseau P, Fournier M (2013). A multibiomarker approach on the Atlantic tomcod (*Microgadus tomcod*) in the St. Lawrence Estuary. *Environmental Science and Pollution Research*. 20: 749-760.
- Evrard E, Devaux A, Bony S, Cachot J, Charrier G, Quiniou L, Laroche J. (2013). Responses of juvenile European flounder (*Platichthys flesus*) to multistress in the Vilaine estuary, during a 6-month survey. *Environmental Science and Pollution Research*. 20: 676-689.
- Galland C, Dupuy C, Auffret M, Quiniou L, Laroche J, Pichereau V (2013) Towards tissue proteome maps in the European flounder (*Platichthys flesus*). *Proteome Sciences*, en révision.
- Galland C, Dupuy C, Capitaine C, Auffret M, Quiniou L, Laroche J, Pichereau V. (2013). Comparisons of liver proteomes in the European flounder *Platichthys flesus* from three contrasted estuaries. *Journal of Sea Research*. 75, 135-141
- Geraudie P., Gerbrón M., Hill E., Minier C. 2010. Roach (*Rutilus rutilus*) reproduction: a study of biochemical and histological parameters in a low contaminated site. *Fish. Physiol. Biochem.* 36: 767-777.
- Geraudie P., Gerbrón M., Minier C. 2010. Seasonal variations and alteration of sex steroid levels during the reproductive cycle of male roach (*Rutilus rutilus*). *Mar. Environ. Res.* 69: S53-S55.
- Geraudie P., Hinfray N., Gerbrón M., Porcher J.-M., Brion F., Minier C. 2011. Brain cytochrome P450 aromatase activity in roach (*Rutilus rutilus*): seasonal variations and impact of environmental contaminants. *Aquat. Toxicol.* 105: 378-384.
- Geraudie P., Lecomte C., Gerbrón M., Hinfray N., Brion F., Minier C. 2010. Endocrine effects of the tapeworm *Ligula intestinalis* in its teleost host, the roach (*Rutilus rutilus*). *Parasitology*. 137: 697-704.
- Gerbrón M., Geraudie P., Rotchell J.M., Minier C. 2010. A new *in vitro* screening bioassay for the ecotoxicological evaluation of the estrogenic responses of environmental chemicals using roach (*Rutilus rutilus*) liver explant culture. *Environ. Toxicol.* 25: 510-516.

- Henry, F., Filipuci, I., Billon, G., Courcot, L., Kerambrun, E., and Amara, R., 2012. Metal concentrations, growth and condition indices in European juvenile flounder (*Platichthys flesus*) relative to sediment contamination levels in four Eastern English Channel estuaries. *Journal of environmental monitoring* 14, 3211-3219.
- Hill, E. M.; Evans, K. L.; Horwood, J.; Rostkowski, P.; Oladapo, F. O.; Gibson, R.; Shears, J. A.; Tyler, C. R. 2010. Profiles and Some Initial Identifications of (Anti)Androgenic Compounds in Fish Exposed to Wastewater Treatment Works Effluents. *Environ. Sci. Technol.*, 44, (3), 1137-1143.
- Hinfray N., Palluel O., Piccini B., Sanchez W., Aït-Aïssa S., Noury P., Gomez E., Geraudie P., Minier C., Brion F., Porcher J.-M. 2010. Endocrine disruption in wild population of chub (*Leuciscus cephalus*) in contaminated French streams. *Sci. Tot. Environ.* 408: 2146-2154.
- Kerambrun E., Henry F., Marechal A., Sanchez W., Minier C., Filipuci I., Amara R. 2012. A multi-biomarker approach in juvenile turbot, *Scophthalmus maximus*, exposed to contaminated sediments. *Ecotox. Environ. Safety.* 80; 45-53.
- Kerambrun, E., Amara, R., Henry, F., 2013. Effects of food limitation on nine metal concentrations in liver and PAH metabolites in bile of juvenile turbot, *Scophthalmus maximus*, previously exposed to contaminated sediments. *Environmental Toxicology and Chemistry* (in press).
- Kerambrun, E., Henry, F., Cornille, V., Courcot, and Amara R., 2013. A combined measurement of bioaccumulation and condition indices in juvenile European flounders, *Platichthys flesus*, from European estuaries. *Chemosphere* 91, 498-505.
- Kerambrun, E., Henry, F., Courcot, L., Gevaert, F. and Amara R., 2012. Biological responses of caged juvenile sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and turbot (*Scophthalmus maximus*) in a polluted harbour. *Ecological Indicators* 19, 161-171.
- Kerambrun, E., Henry, F., Perrichon, P., Courcot, L., Meziane, T., Spilmont, N. and Amara, R., 2012. Growth and condition indices of juvenile turbot, *Scophthalmus maximus*, exposed to contaminated sediments: effects of metallic and organic compounds. *Aquatic Toxicology* 108, 130-140.
- Kerambrun, E., Le Floch, S., Sanchez, W., Thomas-guyon, H., Meziane, T., Henry, F. and Amara, R., 2012. Responses of juvenile sea bass, *Dicentrarchus labrax*, exposed to acute concentrations of crude oil, as assessed by molecular and physiological biomarkers. *Chemosphere* 87, 692-702.
- Kerambrun, E., Sanchez, W., Henry, H., and Amara, R., 2011. Are biochemical biomarker responses related to physiological performance of juvenile sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and turbot (*Scophthalmus maximus*) caged in a polluted harbor? *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C: Toxicology and Pharmacology* 154, 187-195.
- Langston W.J., Pope N., O'Hara S., Pascoe P., Gibbs P. 2013. Indicators of Endocrine Disruption *MBA Annual report*, 11-12
- Langston W.J., Pope N., O'Hara S.C.M. 2012. Indicators of Endocrine Disruption in the English Channel Region. *JMBA, Global Marine Environment*, 15, 26-29.
- Laroche J, Gauthier O, Quiniou L, Devaux A, Bony S, Evrard E, Cachot J, Chérel Y, Larcher T, Riso R, Pichereau V, Devier MH, Budzinski H (2013). Variation patterns in individual fish responses to chemical stress among estuaries, seasons and genders: the case of the European flounder (*Platichthys flesus*) in the Bay of Biscay. *Environmental Science and Pollution Research*. 20: 738-748.
- Marchand J, Quiniou L, Laroche J (2013). Relationship between genotypes and phenotypes in natural populations of the European flounder (*Platichthys flesus*) under different types of contamination in estuaries. *Journal of Xenobiotics* (in press).
- Rostkowski, P.; Horwood, J.; Shears, J. A.; Lange, A.; Oladapo, F. O.; Besselink, H. T.; Tyler, C. R.; Hill, E. M.. 2011. Bioassay-Directed Identification of Novel Antiandrogenic Compounds in Bile of Fish Exposed to Wastewater Effluents. *Environ. Sci. Technol.*, 45, (24), 10660-10667.
- Seemann F., Knigge TA., Rocher B., Minier C. Monsinjon T. 2013. 17 $\beta$ -estradiol induces changes in cytokine levels in head kidney and blood of juvenile sea bass (*Dicentrarchus labrax*, L., 1758). *Marine Environmental Res.* 87-88: 44-51.
- Villeret M., Jolly S., Wiest L., Vulliet E., Bado-Nilles A., Porcher J.-M., Betoulle S., Minier C., Sanchez W. 2012. A potential biomarker of androgen exposure in European bullhead (*Cottus sp.*) kidney. *Fish Physiol Biochem.* DOI 10.1007/s10695-012-9720-3.

#### VII.4. Formation de jeunes chercheurs

Le programme DIESE a permis de financer et de former de jeunes chercheurs au cours d'un doctorat ou d'un post-doctorat.

##### VII.4.1. Liste des thèses soutenues lors du programme DIESE

- Elena Cubero Leon. 2009. Integrated metabolomic and gene expression study of estrogenic response mechanisms in the marine bivalve *Mytilus edulis*. University of Sussex.
- Perrine Géraudie. 2009. Recherche de biomarqueurs de perturbation endocrinienne chez le gardon (*Rutilus rutilus*), intégration des mécanismes moléculaires et écologiques. Université du Havre.
- Kerambrun Elodie. 2011. Evaluation of biological effects of chemical contaminants on juvenile marine fish: a multibiomarker approach in experimental and *in situ* conditions. University of Littoral November 2011.
- Filipuci Isil. 2011. Effects of environmental stressors on coastal fish: in situ and experimental approaches. University of Littoral September 2011.
- Calvès I. 2011. Effets du réchauffement climatique, de l'hypoxie et de la contamination chimique sur les réponses évolutives de populations de flet (*Platichthys flesus*). Thèse de Doctorat, Université de Bretagne Occidentale. 204p.
- Dupuy Célie. 2012. Réponses de populations de poissons au stress chimique en milieux estuariens : intégration des réponses moléculaires, biochimiques et immunotoxicologiques. Thèse de Doctorat, Université de Bretagne Occidentale. 213p.
- Galland Claire. 2012. Réponses du flet européen *Platichthys flesus* à la contamination chimique : approche protéomique. Thèse de Doctorat, Université de Bretagne Occidentale. 259p.
- Villert Mélanie. 2012. Le chabot comme espèce modèle pour l'évaluation des effets des perturbateurs endocriniens. Université de Normandie –ULH.
- Seemann Frauke. 2013. Effets de xéno-œstrogènes sur le système immunitaire du bar, *Dicentrarchus labrax*, au cours du développement. Université de Normandie –ULH.
- Gerbron Marie. 2013. Development and implementation of a combination of *in vitro* and *in vivo* approaches to study endocrine disruptions in roach *Rutilus rutilus*. Université de Normandie –ULH.

Le programme DIESE a contribué à deux autres thèses non achevées lors de la rédaction du rapport final.